

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. Adéla Brabcová

2015

Autoreferát disertační práce

- Doktorand:** Ing. Adéla Brabcová
- Studijní program:** Biotechnologie
- Studijní obor:** Zemědělské biotechnologie
- Název práce:** Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor
- Školitel:** doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
- Konzultant:** Ing. Veronika Bártová, Ph.D.
- Oponenti:** Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D.
Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.
doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Ph.D.

Obhajoba disertační práce se koná dne 4. února 2016 od 10 hodin v zasedací místnosti ZR 01 053 v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

Grantová podpora: NAZV QI91A069
GA JU 029/2012/Z
GA JU 064/2013/Z
GA JU 089/2014/Z

Přehled publikační a grantové činnosti

Impaktované publikace

Lattová E., **Brabcová A.**, Bártová V., Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): *N*-glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(12): 3243-3250.

Bártová V., Bárta J., **Brabcová A.**, Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. Journal of Food Composition and Analysis, 40: 78-85.

Bártová V., Diviš J., Bárta J., **Brabcová A.**, Švajnerová M. (2013): Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. European Journal of Agronomy, 49: 20-31.

Bártová V., Bárta J., Kamenová A., **Staňková A.**, Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Chemické Listy, 106: 365-372.

Recenzované publikace

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2014): Antioxidační aktivita patatinu izolovaného z brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 163-66.

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2013): Variability of the lipid acyl hydrolyse activity of patatin within the selected genotypes of potato species from South America. Proceedings of the 2nd International Symposium on Agronomy and Physiology of potato „Potato AgroPhysiology 2013“, 15-19 September 2013, Pratur, pp 205 – 211. (ISBN 978-80-86940-52-6).

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2013): Stanovení aktivity fosfolipasy A₂ u bílkovin patatinového komplexu purifikovaných z hlíz vybraných druhů brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 138-41.

Bártová V., **Brabcová A.**, Bárta J., Horáčková V. (2013): Využití čipové elektroforézy pro charakterizaci genových zdrojů bramboru. Přijato k publikování v rámci mezinárodní konference Osivo a Sadba 2013.

Bárta J., **Brabcová A.**, Bártová V., Horáčková V. (2013): Hodnocení potenciálu vybraných planých druhů rodu *Solanum* pro šlechtění bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na obsah a kvalitu bílkovin v hlízách. Přijato k publikování v rámci odborného a vědeckého semináře Osivo a Sadba 2013.

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2012): Genotypová variabilita lipidacylhydrolasové aktivity u patatinových bílkovin purifikovaných z hlíz vybraných druhů brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 139-142.

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2011): Studium proteinových profilů hlíz vybraných genotypů kulturních druhů brambor pomocí čipové elektroforesy. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 145-148.

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V., Čurn V. (2010): Frakcionace hlízových bílkovin u vybraných druhů z rodu *Solanum*. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 159-162.

Metodika

Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., **Brabcová A.**, Kamenová A., Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor. Certifikovaná metodika. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 38 p. (ISBN 978-80-7394-405-6)

Monografie

Bárta J., Bártová V., **Brabcová A.**, Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT, České Budějovice, 115 p.

Užitný vzor

Bárta J., Bártová V., Kamenová A., Zdráhal Z., **Brabcová A.**, Čurn V. (2012): Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností. CZ 23983 U1, užitný vzor zapsán Úřadem průmyslového vlastnictví dne 18. 6. 2012.

Řešené granty:

- 1) Spoluřešitel grantu NAZV QI91A069 „Hodnocení potenciálu proteinů planých genotypů brambor pro využití ve šlechtění bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a v biotechnologiích“ (doba řešení: 2009-2013)
- 2) Hlavní řešitel grantu GA JU 029/2012-Z „Hodnocení substrátové specifity enzymových aktivit purifikovaných bílkovin patatinového komplexu z hlíz vybraných druhů brambor.
- 3) Hlavní řešitel grantu GA JU 064/2013-Z „Hodnocení aktivity fosfolipasy A₂ u bílkovin patatinového komplexu purifikovaných z hlíz vybraných druhů brambor (*Solanum* ssp.)“.
- 4) Spoluřešitel grantu GA JU 058/2013/Z „Biologicky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách“.
- 5) Hlavní řešitel GA JU 089/2014/Z „Antioxidační aktivita bílkovin patatinového komplexu u brambor“.

Souhrn výše uvedených výsledků

Články s IF	4
- suma IF	7,87
Recenzované články bez IF	8
Ostatní (metodika, monografie, užitný vzor)	3
Články zaslané k opublikování do časopisů s IF	0
Hlavní řešitel grantů	3
- suma finančních prostředků	319.000 Kč
Spoluřešitel grantů	2

I. CÍLE A HYPOTÉZY DISERTAČNÍ PRÁCE

Cíle práce:

Cílem disertační práce bylo studium variability vlastností a struktury patatinových bílkovin u vybraných genotypů netradičních kulturních a planých druhů brambor. U uvedené skupiny bílkovin byly hodnoceny rozdíly základních biochemických parametrů, struktury a biologických aktivit zejména enzymových, kterými rodina těchto bílkovin disponuje.

Dílčí cíle:

- Morfologický popis hlíz netradičních a planých druhů brambor a ověření ploidity z listů těchto druhů pomocí průtokové cytometrie.
- Studium proteinových spekter pomocí elektroforetických technik (SDS-PAGE, PAGE, čipová elektroforéza).
- Purifikace patatinů z hlíz pomocí chromatografických technik.
- Detailní popis strukturních a biochemických vlastností patatinů pomocí moderních proteomických technik (2D PAGE, IEF, MS).
- Detekce lipidacylhydrolasové aktivity purifikovaných patatinů z hlíz kvalitativně (na polyakrylamidovém gelu) a kvantitativně (spektrofotometricky) a detekce rozdílů při použití substrátů s mastnými kyselinami o rozdílném počtu uhlíků v uhlovodíkovém řetězci.
- Ověření dalších vybraných enzymových aktivit patatinu, zejména fosfolipasové aktivity A₂.
- Ověření antioxidační aktivity patatinu a patatinových štěpů získaných enzymaticky.

Na základě dostupných informací a dat byly navrženy tyto hypotézy:

- Bílkoviny patatinového komplexu (patatiny) netradičních kulturních a planých druhů brambor lze izolovat pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie v požadované čistotě a kvalitě.
- Patatiny (resp. jejich hmotnostní isoformy) netradičních a planých druhů brambor se budou v rámci genotypů výrazně lišit.
- U patatinů purifikovaných z hlíz netradičních kulturních a planých druhů brambor budou pozorovány výrazné rozdíly v enzymových aktivitách.
- U sledovaných genotypů budou detekovány kvantitativní i kvalitativní rozdíly v enzymové aktivitě při použití substrátů s mastnými kyselinami o rozdílném počtu C v uhlovodíkovém řetězci.
- U purifikovaných patatinů z hlíz netradičních a planých druhů brambor lze detekovat jiné enzymové aktivity jako např. fosfolipasovou aktivitu.
- Patatiny izolované z netradičních kulturních a planých druhů brambor budou vykazovat výrazně odlišnou antioxidační aktivitu.

II. ÚVOD

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* subs. *tuberosum*) patří mezi oblíbenou plodinu s vysokou výnosovou schopností v celosvětovém měřítku. Celková světová produkce brambor byla dle údajů FAO pro rok 2012 odhadnuta na 364 808 768 tun. V České republice bylo podle údajů ČSÚ v roce 2013 osázeno celkem 29 301 ha bramboru (z toho 23 205 ha v zemědělském sektoru) a produkcí 536 500 tun brambor. Ve Státní odrůdové knize ČR je v současné době zapsáno 141 odrůd. V současné době mohou být u nás pěstovány odrůdy registrované v ČR a v ostatních státech EU (Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin). Hlízy, zásobní a reprodukční orgány rostliny, jsou důležitou potravinou pro přímý konzum (po tepelné úpravě) a na výrobu potravinářských výrobků a důležitou průmyslovou surovinou pro zpracovatelský průmysl na výrobu bramborového škrobu.

Bílkoviny hlíz brambor jsou jedny z nejhodnotnějších bílkovin rostlinného původu a pro výživu mají, díky vyšší spotřebě, nezanedbatelný význam. Hlízy bramboru mají také vhodný obsah sacharidické složky, vitamínů (zejména vitamínů C) a minerálních látek (zejména draslík a hořčík). Průměrné složení hlíz po uvaření ve slupce na 100 g je 77 g vody, 1,87 g dusíkatých látek, 5 mg vápníku, 0,1 g tuku, 379 mg draslíku, 150 mg vitamínu C, 44 mg fosforu, 0,31 mg železa, 1,44 mg niacinu, 0,106 mg thiaminu a 0,02 mg riboflavinu (Singh and Kaur 2009). Bílkoviny nejsou v hlízách zastoupeny ve velkém množství, zaujímají asi 1 % z čerstvé hmoty, nutriční hodnota je však vysoká a mají velmi zajímavé vlastnosti využitelné v biotechnologických aplikacích.

Bílkoviny patatinového komplexu neboli patatiny jsou glykoproteiny, jejichž funkce je především zásobní (Pots et al. 1999). Funkce zásobní však není jedinou, kterou tato homogenní skupina isoformů má. Potvrzena byla řada enzymových aktivit (Jiménez-Atiéndzar et al. 2003; Cenzano et al. 2008) a antioxidační aktivita (Wang & Xiong 2005). Patatiny mají řadu výhodných vlastností, jako je například schopnost tvorby pěn, nebo funkce stabilizačního prvku, umožňující jejich použití v potravinářství, nebo v různých odvětvích průmyslu (Koningsveld et al. 2006). Mezi negativní vlastnost patatinů patří schopnost vyvolat alergenní reakci při styku hlízy v syrovém stavu a kůže (Seppälä et al. 1999).

V souvislosti s enzymovými aktivitami patatinu byla vytvořena řada hypotéz (Strickland et al. 1995; Pots 1999, Sharma et al. 2004, Candido et al. 2011) o možné účasti v obranném systému hlízy a vztahu ke stresovým či obranným reakcím. Kulturní druh *Solanum tuberosum*, který je běžně v Evropě pěstován, patří také mezi plodiny s vysokou náchylností

k chorobám. Stále se tedy hledají genetické zdroje rezistence, které by mohly být využity při šlechtění. Variabilita mezi odrůdami je díky těsné příbuznosti omezená a zdrojem alelické diversity jsou tedy netradiční kulturní druhy brambor či druhy plané. Tyto druhy nesou cenné vlastnosti včetně rezistencí k abiotickým a biotickým stresům (Bradshaw et al. 1994). Původní výskyt těchto druhů je Jižní a Střední Amerika, kde jsou i dnes pěstovány a konzumovány. Informace o bílkovinné skladbě, strukturních a biochemických vlastnostech jednotlivých bílkovin jsou u těchto druhů neznámé nebo velmi omezené.

III. MATERIÁL A METODY

Materiál

Použity byly tři skupiny genotypů brambor z rodu *Solanum*: odrůdy kulturního druhu *S. tuberosum* (jako skupina kontrolních genotypů), genotypy ostatních kulturních druhů *S. andigenum*, *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. goniocalyx* a skupina vybraných genotypů planých druhů. Rostlinný materiál byl primárně získán z Genové banky bramboru udržované ve Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod spol. s r.o. a to ve formě rostlinných explantátů či ve formě mikrohlízek. Pro větší spotřebu byl materiál přemnožen ve skleníkových podmínkách ZF JU. Do experimentů bylo zařazeno celkem 89 genotypů brambor.

Přehled použitých metod

U výchozího materiálu a u izolovaných bílkovin byly použity následující vybrané analytické metody a stanovení použité při řešení disertační práce.

- Gravimetrie - stanovení obsahu sušiny (% čerstvé hmoty hlíz) pomocí lyofilizace
- Instrumentální analýza - stanovení obsahu dusíkatých látek v sušině hlíz modifikovanou Dumasovou metodou (EA 1112 Flash, ThermoQuest, USA/Itálie)
- Fotometrické stanovení obsahu bílkovin v sušině hlíz pomocí denaturační extrakce a prostřednictvím BCA analýzy (Smith et al., 1985)
- Čípková elektroforéza (Bio Rad, USA) - stanovení relativní abundance proteinů v intervalu molekulových hmotností výskytu patatinových proteinů a kontrola purifikace patatinů
- SDS-PAGE - separace celkových hlízových bílkovin, kontrola postupu izolace patatinu a ověření čistoty
- PAGE – separace hlízových bílkovin v nativním stavu, stanovení enzymových aktivit esteras a peroxidas celkových proteinů a patatinů (modifikováno dle práce Bárta et al. 2003)

- Iontovýměnná a afinitní chromatografie - použité médium DEAE-52 Cellulose a Concanavalin A Sepharose 4B
- Stanovení LAH aktivity – spektrofotometricky (BioMate 5, ThermoElectron) dle metodiky Pots (1999), Pinsirodom & Parkin (2003) a dle Wrolstad et al. (2001) s použitými substráty *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl laurate a *p*-nitrophenyl stearate.
- Stanovení fosfolipasové aktivity – spektrofotometricky (BioMate 5, ThermoElectron) dle metodiky Jiménez-Atiénzar et al. (2003)
- Stanovení antioxidační aktivity ABTS testem dle metodiky Šulc et al. (2007)
- 2D-PAGE - detailní analýza isoform patatinu
- Isoelektrická fokusace – určení isoelektrických bodů isoform patatinu
- Hmotnostní spektrometrie - stanovení molekulové hmotnosti jednotlivých isoform a analýza počtu glykosylací, ověření identity patatinu, detailní analýza isoform

IV. VÝSLEDKY

IV.1 Purifikace patatinů z hlíz netradičních kulturních a planých druhů brambor

Schopnost izolovat patatiny od ostatních bílkovin hlíz v požadovaném množství, kvalitě a čistotě je prvním základním předpokladem pro studium strukturních i biochemických vlastností. Izolace patatinů z hlíz či hlízové šťávy kulturních druhů brambor byla úspěšně provedena již v minulosti. Jedním z cílů disertační práce bylo optimalizovat a navrhnout šetrný způsob izolace patatinů z hlíz netradičních a planých druhů brambor tak, aby byly respektovány jejich požadavky na homogenitu a zachování biologických vlastností. Cílem byla také optimalizace pracovních postupů na měření lipidacylhydrolasové aktivity patatinů, která je z literárně uváděných enzymových aktivit nejvýznamnější. V souvislosti s hlízami planých druhů byly řešeny problémy spojené s malou velikostí a tím i hmotností hlíz, což mělo za následek malé množství materiálu pro další analýzy. V souvislosti s tím bylo přistoupeno k izolaci bílkovin z hlíz planých druhů výhradně ze sušiny a nikoliv z hlízové šťávy.

Základním prvkem separačního procesu byl zvolen dvoustupňový postup, kdy v prvním kroku byla provedena iontovýměnná chromatografie na anexu (celulosevé médium s ligandem DEAE či obdobným typem) následovaná ve druhém kroku afinitní chromatografií (agarosové médium se specifickým ligandem lektinem konkanavalinem A). Purifikace patatinu byla poté finalizována odsolením pomocí gelové filtrace. Uvedená strategie purifikace je aplikovatelná pro separaci hlízových proteinů jak u rozdílných genotypů brambor (odrůdy *S. tuberosum*, netradiční kulturní druhy, plané druhy), tak i pro rozdílné formy vstupního materiálu.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v certifikované metodice „Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor“, kde jsou popsány principy izolace bílkovin brambor, vstupní materiál pro izolaci a jeho formy a úpravy, detailní postup dvoustupňové purifikace, postup separace frakcí hlízových proteinů a postup měření a hodnocení biologických aktivit.

Certifikovaná metodika se shrnutými informacemi týkající se této problematiky:

Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., **Brabcová A.**, Kamenová A., Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor. Certifikovaná metodika. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 38 p. (ISBN 978-80-7394-405-6).

IV.2 Základní strukturní vlastnosti patatinů

Informací o bílkovinách v hlízách planých a netradičních kulturních druhů je velmi málo a v současné době neexistuje přehledná studie, která by mohla sloužit jako informační základ pro budoucí šlechtění a následné využití hlízových bílkovin těchto druhů. Monografie „Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*“, respektive kapitola 3.2 „Bílkoviny v hlízách vybraných druhů brambor rodu *Solanum*“ této monografie, se takový ucelený soubor informací o strukturních a biochemických vlastnostech hlavních hlízových bílkovin netradičních kulturních a planých druhů brambor snaží vytvořit.

V kapitole „Bílkoviny v hlízách vybraných druhů brambor rodu *Solanum*“ jsou souhrnné informace rozděleny do 10 podkapitol – 1) Banka genetických zdrojů bramboru, její činnost a charakter kolekce brambor, 2) Základní charakteristika hodnocených druhů brambor a jejich kultivace, 3) Hmotnost a obsah sušiny hlíz hodnocených druhů brambor, 4) Obsah bílkovin v hlízách hodnocených druhů brambor, 5) Obsah patatinu a frakce inhibitorů proteas v hlízách a jejich zastoupení v bílkovinném profilu hlíz hodnocených druhů brambor, 6) Charakteristika patatinů izolovaných z hlíz hodnocených druhů brambor, 7) Enzymové aktivity patatinů izolovaných z hlíz hodnocených druhů brambor, 8) Charakteristika a aktivity frakce hlízových inhibitorů proteas hodnocených druhů brambor, 9) Charakteristika a aktivity frakce bílkovin s hemaglutinační aktivitou, 10) Porovnání skladby bílkovin v hlízách planých a kulturních druhů brambor a její potenciální využití ve šlechtění bramboru.

Hodnocen byl soubor 5 kulturních, 5 netradičních kulturních a 19 planých druhů brambor. V rámci tohoto souboru byla zjištěna kvantitativní a kvalitativní variabilita hlízových bílkovin. Hodnoceny byly základní parametry, jako je průměrná hmotnost hlíz, obsah sušiny, obsah dusíku a obsah bílkovin. Detailně byla popsána patatinová frakce a to na úrovni strukturní (molekulové hmotnosti, relativní abundance), tak biochemické (enzymové aktivity). U souboru hodnocených druhů brambor byla nalezena úroveň obsahu bílkovin v čerstvé hmotě hlíz v rozpětí 0,68 – 2,49 % a v sušině hlíz v intervalu 3,42 – 9,18 %. Obsah bílkovin přes 2 % v čerstvé hmotě hlíz byl nalezen u druhů *S. sparsipilum*, *S. sucrense* a *S. acaule*. Obsah patatinu v čerstvé hmotě hlíz byl nejvyšší u druhu *S. acaule* (0,83 %), relativní abundance patatinu byla nejvyšší v bílkovinném profilu hlíz *S. verrucosum* (41,4 %). U purifikovaného patatinu tohoto souboru planých a kulturních genotypů byla zjištěna variabilita v glykosylaci polypeptidu a počtu isoform na podobné úrovni jako u odrůd *S. tuberosum*. Také byla nalezena aktivita lipidacylhydrolasy pro substrát *p*-nitrofenylbutyrát v rozpětí 2,67 $\mu\text{mol}/[\text{min mg}]$ (cv. Desirée, *S. tuberosum*) – 22,74 $\mu\text{mol}/[\text{min mg}]$ (*S. bulbocastanum*). U purifikovaného patatinu byla také nalezena aktivita fosfolipasy A_2 .

Na základě zjištěných informací lze konstatovat, že netradiční kulturní a plané druhy brambor mohou být využity pro zlepšování poolu hlízových bílkovin odrůd *S. tuberosum*. Pro zlepšování obsahu a zastoupení patatinových bílkovin by mohly být perspektivní tetraploidní druhy *S. acaule* a *S. sucrense*.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v kapitole 3.2 „Bílkoviny v hlízách vybraných druhů brambor rodu *Solanum*“ monografie:

Bárta J., Bártová V., **Brabcová A.**, Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. Kurent, České Budějovice, 115 p.

Cílem této části disertační práce bylo rovněž u izolovaných patatinů vybraných druhů brambor analyzovat a popsat N-glykanové profily. Pro mapování glykanových profilů byly vybrány netradiční kulturní druhy, které se ukázaly v průběhu studia bílkovin jako zajímavé s možnostmi dalšího uplatnění – *Solanum andigenum*, *Solanum goniocalyx*, *Solanum phureja* a *Solanum stenotomum* a pro porovnání odrůda Desirée kulturního druhu *Solanum tuberosum*. Oligosacharidy (N-glykany) byly získány enzymatickou digescí s PNGázou A z nativních patatinů a označeny PHN (fenylyhydrazin, +90,05 Da) a pomocí MALDI-TOF/TOF MS byla vytvořena spektra N-glykanových profilů patatinů.

Analýza glykosylačních míst potvrdila přítomnost glykanových struktur, které nebyly u patatinů brambor dříve popsány a v rámci hodnoceného souboru genotypů se výrazně lišily. Hlavní glykanová struktura, která byla nalezena u všech analyzovaných genotypů odpovídala typickým fukosylovaným rostlinným glykanům s xylosami v jádru s manosami (m/z 1301). Detailní analýza glykosylačních profilů patatinů však prokázala přítomnost více oligosacharidových struktur s výraznými rozdíly v profilech mezi jednotlivými druhy, resp. genotypy brambor.

Tyto poznatky o glykosylaci patatinů mohou být užitečné pro správný výběr odrůdy s nižším obsahem specifických glykanů, které způsobují potravinové alergie a také pro využití brambor pro výrobu proteinů s léčivými účinky.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v publikaci:
Lattová E., **Brabcová A.**, Bártová V., Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): *N*-glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(12): 3243-3250.

IV.3 Enzymová a antioxidační aktivita patatinů

U patatinových bílkovin byly zjištěny enzymové aktivity, u kterých byly vytvořeny hypotézy naznačující možnou účast těchto bílkovin v obranném systému hlíz. Biochemické vlastnosti patatinů s možným vztahem k obrannému systému jako je aktivita nespecifické lipidacylhydrolasy, aktivita cytosolové fosfolipasy A₂ a A₁, aktivita β-1,2-xylosidasy a antimikrobiální aktivita patatinových bílkovin byly shrnuty v referátu:

Bártová V., Bárta J., Kamenová A., **Staňková A.**, Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Chemické Listy, 106: 365-372.

Aktivita lipidacylhydrolasy

Aktivita lipidacylhydrolasy (LAH) je nejvýznamnější enzymová aktivita, která je s patatiny spojována a která byla potvrzena u všech doposud analyzovaných odrůd kulturního druhu *Solanum tuberosum*. Informace týkající se enzymových aktivit u genotypů netradičních či planých druhů brambor však chybějí.

LAH aktivita patatinu byla hodnocena u souboru 44 genotypů netradičních a planých druhů brambor. Hodnocena byla jak kvalitativně na polyakrylamidovém gelu, tak kvantitativně spektrofotometricky. Součástí studia LAH aktivity patatinů byla také detekce kvalitativních i kvantitativních rozdílů při použití substrátů s mastnými kyselinami o rozdílném počtu uhlíků v řetězci a kinetická charakterizace vyjádřená parametry K_m a V_{max}.

Vzhledem k projevu intenzity enzymové aktivity LAH na gelu byl jako nejvhodnější substrát vyhodnocen α-naftyl butyrát a α-naftyl acetát, s jejichž použitím byla LAH aktivita detekována u všech patatinů izolovaných z vybraných genotypů brambor. Při kvalitativním stanovení byl hodnocen počet detekovaných pruhů, intenzita a stanovena relativní mobilita, která se pohybovala od 0,75-0,89. Při kvantitativním hodnocení LAH aktivity patatinů byla hodnocena specifická aktivita, která se velmi lišila při použití různých typů substrátů. Nejvyšší specifická aktivita byla zjištěna při použití substrátu *p*-nitrofenyl butyrát, který vykazoval nejvyšší úroveň aktivity. Specifická aktivita se při použití tohoto substrátu pohybovala v širokém rozpětí od 2,63 (*Solanum tuberosum* odrůda Desirée) do 31,33 (*Solanum sucrense*) μmol/[min mg].

Výsledky ukázaly, že patatiny netradičních kulturních a planých druhů brambor vykazují vysokou úroveň lipidacylhydrolasové aktivity a pro praktické využití mohou být významným zdrojem těchto bílkovin. Jako velmi zajímavý se jeví obzvláště druh *Solanum sucrense*. Patatin izolovaný z tohoto genotypu vykazoval jedny z nejvyšších hodnot v relativním

zastoupení v celkovém bílkovinném spektru, byla u něj zaznamenána nejvyšší aktivita lipidacylhydrolasy a rovněž je tento druh díky totožné ploidii (zejména EBN) křížitelný s odrůdami kulturního druhu bramboru.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v publikacích:

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2013): Variability of the lipid acyl hydrolyse activity of patatin within the selected genotypes of potato species from South America. Proceedings of the 2nd International Symposium on Agronomy and Physiology of potato „Potato AgroPhysiology 2013“, 15-19 September 2013, Pratur, pp 205 – 211. (ISBN 978-80-86940-52-6).

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2012): Genotypová variabilita lipidacylhydrolasové aktivity u patatinových bílkovin purifikovaných z hlíz vybraných druhů brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 139-142.

Aktivita fosfolipasy A₂ (PLA₂)

Fosfolipasová aktivita je další enzymovou aktivitou, která je s patatiny dávána do souvislosti. V odborných publikacích jsou předmětem studia opět výhradně odrůdy kulturního druhu *Solanum tuberosum*, studium této enzymové aktivity u bílkovin netradičních či kulturních druhů zcela chybí. Cílem bylo zhodnotit úroveň fosfolipasové aktivity u těchto druhů a na základě dalších zjištění navrhnout nejlepší genotypy, které by mohly být použitelné při šlechtění rostlin.

Fosfolipasová aktivita, která byla hodnocena na souboru patatinů izolovaných z kulturních, netradičních kulturních a planých druhů brambor, byla detekována spektrofotometricky. V průběhu měření se potvrdil předpoklad týkající se silné závislosti aktivity na pH prostředí. Nejvyšší aktivita fosfolipasy A₂ byla zaznamenána u planých druhů *Solanum leptophyes* (9,26 μmol/[min. mg]) a *Solanum fendleri* (8,52 μmol/[min. mg]) a netradičních kulturních druhů *Solanum goniocalyx* (9,03 μmol/[min. mg]) a *Solanum stenotomum* (6,91 μmol/[min. mg]).

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v publikaci:

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2013): Stanovení aktivity fosfolipasy A₂ u bílkovin patatinového komplexu purifikovaných z hlíz vybraných druhů brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 138-14.

Antioxidační aktivita

Volné radikály mají řadu fyziologických funkcí a v současné době se jim věnuje velká pozornost a to zejména z důvodu jejich působení na biologicky významné sloučeniny, mezi které bílkoviny patří. Cílem studia tedy bylo hodnocení antioxidační aktivity patatinu, jakožto hlavní hlízové bílkoviny. Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno testem s využitím ABTS a měření spekrofotometricky. Antioxidační aktivita byla stanovena u patatinových bílkovin izolovaných z netradičních kulturních i planých druhů brambor a také u patatinových hydrolyzátů (štěpů), které byly získány po enzymovém štěpení trypsinem a alkalasou.

Antioxidační aktivita byla u patatinů i jejich hydrolyzátů potvrzena v celém souboru hodnocených genotypů kulturních i planých druhů brambor. U patatinu se pohybovala v rozpětí od 0,03 (*S. andigenum*) do 0,14 (*S. sucrense*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny patatinu. Antioxidační aktivita patatinových štěpů byla dle předpokladu mnohonásobně vyšší. Při použití trypsinu jako štěpícího enzymu se antioxidační aktivita pohybovala v rozpětí od 4,3 (*S. tuberosum*, Desirée) do 42,8 (*S. sucrense*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny štěpů. Při použití alkalasy se antioxidační aktivita pohybovala od 38,3 (*S. chaucha*) do 551,0 (*S. andigenum*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny štěpů. Výrazné rozdíly v antioxidační aktivitě patatinů i jejich štěpů jsou zřejmě závislé na změnách v sekvenci aminokyselin, která se u jednotlivých genotypů může lišit. Je však zřejmé, že enzymatická hydrolýza bílkovin může vést ke zlepšení nutričních a dalších vlastností bílkovin a je tedy efektivní metodou pro přípravu aktivních peptidů vykazujících antioxidační vlastnosti.

Zjištěná antioxidační aktivita může mít u kulturního druhu využití v potravinářství jako konzervačních látek, jako doplňku zabraňující oxidaci tuků, nebo jako dochucovadla zvyšující nutriční hodnotu. U netradičních a planých druhů brambor lze využití spatřovat zejména ve šlechtění pro zlepšení vlastností komerčních odrůd.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v publikaci:

Brabcová A., Bárta J., Bártová V., Horáčková V. (2014): Antioxidační aktivita patatinu izolovaného z brambor. Vědecká příloha časopisu Úroda, 12: 163-66.

IV.4 Nutriční hodnota hlízových bílkovin

Bílkoviny hlíz bramboru mají vysokou nutriční hodnotu a informací o obsahu bílkovin a obsahu patatinových bílkovin je u kulturního druhu *Solanum* poměrně mnoho. Pro zvyšování bílkovin v hlízách bramboru jsou zejména dva důvody, které popsal Bradshaw et al. (1994) a to a) výhodná bilance příjmu bílkovin u konzumentů v zemích s vysokou spotřebou brambor na obyvatele, nebo pro konzumenty v hospodářsky slabších regionech; b) při zpracování brambor na škrob jsou společně se škrobem získávány i bílkoviny, které je možné dle způsobu izolace dále využít buď jako krmivo pro hospodářská zvířata (denaturační varianta izolace), nebo lze, při zachování nativního stavu bílkovin, využít jejich enzymových či technologických vlastností (např. pěnovost, emulgační vlastnosti, schopnost tvořit gely, vazba vody a tuku atd.) pro praktické využití v potravinářství a medicíně.

Cílem této části práce bylo ve vybraném souboru netradičních kulturních druhů brambor *Solanum andigenum*, *Solanum goniocalyx*, *Solanum phureja*, *Solanum stenotomum* a kulturního druhu *Solanum tuberosum* odrůda Desirée hodnotit aminokyselinové složení bílkovin a jejich nutriční hodnotu a to na úrovni sušiny hlíz, celkového proteinu a patatinové frakce. Na všech 3 úrovních byl z hlediska aminokyselinového složení hodnocen obsah neesenciálních a esenciálních aminokyselin, z hlediska nutriční hodnoty bylo hodnoceno aminokyselinové skóre (AAS) a index esenciálních aminokyselin (EAAI). Součástí studie aminokyselinového složení hlíz netradičních druhů brambor je také popis purifikovaných patatinů na úrovni počtu isoform, přesných molekulových hmotností a relativní abundance pomocí moderních proteomických metod - MS analýz (MALDI-TOF) a analýz na automatické čipové elektroforéze. U hlízy vybraných druhů brambor byla také provedena kvantitativní analýza antinutričních dusíkatých složek (α -solanin, α -chakonin, β -chakonin, solanidin) z hlíz vybraných netradičních druhů brambor.

Studie aminokyselinového složení a nutriční hodnoty patatinů izolovaných z netradičních druhů brambor potvrdila vysokou nutriční hodnotu patatinových bílkovin a vysokou kvalitu hlízových bílkovin celkově. Zejména u druhu resp. genotypu *Solanum goniocalyx* byla zjištěna vyšší hodnota EAAI (112,5 %) a prokázán byl také příznivý poměr proteinových a neproteinových dusíkatých látek v hlízách. Na základě výsledků lze tedy označit *Solanum goniocalyx* jako druh se slibným potenciálem pro uplatnění ve šlechtění rostlin a ve výživě člověka i zvířat.

Kompletní informace týkající se této problematiky jsou shrnuty v publikaci:

Bártová V., Bárta J., **Brabcová A.**, Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40: 78-85.

V. ZÁVĚR

Předložená disertační práce shrnuje výsledky studia majoritní skupiny hlízových bílkovin brambor - patatinů, které byly izolovány z vybraných netradičních kulturních a planých druhů brambor. Stěžejními výsledky, které byly zde předkládány, jsou výsledky o biochemických vlastnostech, enzymových aktivitách a nutriční hodnotě patatinů, které společně s morfologickým popisem hlíz a dalšími informacemi o hlízách těchto druhů (například obsah sušiny, průměrná hmotnost hlíz, obsah dusíkatých látek) utváří ucelený soubor informací o těchto v Evropě netradičních druzích. Následující závěry odpovídají hlavním a dílčím cílům disertační práce a odpovídají na stanovené hypotézy.

Jedním z hlavních cílů disertační práce byl morfologický popis hlíz netradičních kulturních a planých druhů hlíz a ověření ploidity. Hodnoceny byly tři skupiny genotypového materiálu. První skupinu tvořila kontrolní skupina odrůd druhu bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) – zahrnuty byly jak konzumní odrůdy, tak odrůdy pro zpracovatelské účely. Druhá skupina zahrnovala druhy, které jsou pěstitelsky využívány v zemi svého původního výskytu (netradiční kulturní druhy) a třetí skupina zahrnovala genotypy planých druhů. Součástí monografie „Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*“ respektive její přílohy je fotodokumentace souboru netradičních a kulturních druhů (genotypů) hlíz. V rámci vybraného souboru netradičních a planých druhů brambor byly zaznamenány výrazné rozdíly ve tvaru hlíz, barvě slupky i dužniny a to i v rámci genotypů téhož druhu. Značné rozdíly mezi všemi třemi soubory genotypů byly zjištěny při hodnocení průměrné hmotnosti hlíz (rostliny byly shodně pěstovány ve vědrech), kdy u souboru kontrolních odrůd druhu *S. tuberosum* bylo dosaženo průměrné hodnoty 30,5 g, u netradičních kulturních druhů byla průměrná hodnota 14,7 g a u souboru planých genotypů už pouze 2,7 g. Za povšimnutí stojí především vysoká průměrná hodnota hlíz u genotypu *S. goniocalyx* a to 54,5 g, protože bez tohoto genotypu by byla průměrná hodnota u souboru netradičních kulturních druhů (genotypů) výrazně nižší a to jen 4,8 g. Sušina hlíz se pohybovala v intervalu 18,2 (*S. mochiguense*) – 38,3 (*S. yungasense*) %. V porovnání s předchozím parametrem nebyly zjištěny výraznější rozdíly v průměrných hodnotách v rámci tří hodnocených souborů (kontrolní odrůdy druhu *S. tuberosum* měly průměr obsahu sušiny 24,6 %, netradiční kulturní genotypy 24,8 % a plané genotypy 25,8 %). U souboru planých genotypů byl obsah sušiny nejvíce variabilní. Při hodnocení obsahu dusíku bylo nalezeno rozpětí hodnot od 0,30 (*S. tuberosum*, cv. Russet Burbank) do 1,02 (*S. sucrense*) % v původní hmotě hlíz. Za obvyklý obsah dusíku v hlízách je možné považovat hodnoty do 0,5 %, což při použití přepočítávacího

koeficientu představuje okolo 3 % dusíkatých látek v původní hmotě hlíz. Otázkou ale je, zdali je použití koeficientu 6,25 pro přepočet dusíku na dusíkaté látky u brambor vhodné, vzhledem k vysokému zastoupení volných amidů v hlízách. Z tohoto důvodu jsou uváděny pouze hodnoty obsahu N. Obsah bílkovin v původní hmotě hlíz se u analyzovaných genotypů pohyboval také v poměrně širokém rozpětí od 0,80 (*S. bulbocastanum*) do 2,39 (*S. pinnatisectum*) % a to především kvůli skupině planých druhů. Kromě *S. bulbocastanum* měly všechny ostatní sledované druhy obsah bílkovin v původní hmotě hlíz vyšší než 1 %. Obsah bílkovin v hlízách je tedy možné u celého souboru genotypů hodnotit jako vysoký. Kromě *S. pinnatisectum* měly velmi vysoký obsah bílkovin (nad 1,9 %) v původní hmotě hlíz také *S. yungasense* (2,10 %) a *S. andigenum* (1,96 %). Kvalita bílkovin je ovlivněna zastoupením bílkovinných frakcí a jejich aminokyselinovou skladbou. Výsledky kvantifikace patatinové frakce byly získány pomocí spektrofotometrického stanovení, analýzy relativního zastoupení prostřednictvím čipové elektroforézy a pomocí profilů hlízových bílkovin s použitím analýzy SDS-PAGE. Patatin resp. jeho isoformy byly v souboru hodnocených druhů zastoupeny v rozsahu od 0,13 (*S. bulbocastanum*) do 0,83 (*S. acaule*) % čerstvé hmoty hlíz. Častějším vyjádřením kvantity patatinu je však relativní abundance v celkovém bílkovinném profilu hlíz (PRA) a ta byla u sledovaného souboru genotypů vyjádřena v rozpětí 9,0 (*S. pinnatisectum*) – 41,4 (*S. verrucosum*) %. Toto rozpětí představuje zároveň variabilitu zjištěnou u souboru reprezentující plané druhy brambor a kromě druhu *S. verrucosum* byla hodnota PRA nad 35 % nalezena taktéž u druhů *S. incamaoyense* a *S. leptophyes* a pro úplnost i u odrůd *S. tuberosum* Russet Burbank a Westamyl. Z porovnání průměrných hodnot PRA hodnocených souborů genotypů vyplynulo, že odrůdy *S. tuberosum* měly vyšší hodnotu PRA (30,5 %), než soubor kulturních netradičních druhů (28,2 %) a než soubor planých druhů (26,8 %). Plané druhy brambor je možné z pohledu PRA považovat za zdroj značné variability, nelze však říci, že by plané druhy obecně dosahovaly vyšších hodnot PRA.

Jedním z hlavních cílů disertační práce bylo ověření možnosti izolace patatinu z hlíz netradičních a planých druhů bramboru, jelikož jejich izolace od ostatních hlízových proteinů v požadované čistotě, množství a kvalitě je základní požadavek pro jejich studium. Isolace patatinů byla provedena ve dvou krocích pomocí inotovýmienné chromatografie na anexu (celulosové médium s ligandem DEAE) a afinitní chromatografie (agarosové médium se specifickým ligandem lektinem konkanavalinem A). Purifikace patatinu byla poté finalizována odsolením pomocí gelové filtrace. Tento postup se ukázal být ideální a univerzální jak pro všechny typy vstupního materiálu, tak pro rozdílné genotypy brambor (odrůdy *S. tuberosum*, netradiční kulturní druhy, plané druhy).

Dalším hlavním cílem disertační práce bylo studium strukturních a biochemických vlastností izolovaných patatinů z hlíz vybraných genotypů brambor. Pozornost byla věnována zejména studiu variability v počtu glykosylací a rozsahu enzymových aktivit. Výsledky měření úrovní molekulové hmotnosti v rámci izolovaných vzorků patatinových komplexů potvrdily tři hmotnostní úrovně o přibližné molekulové úrovni 40,5; 41,7 a 42,9 kDa, reprezentující tři úrovně glykosylací. Ve většině případů se jedná o odchylky v rozmezí 200 – 400 Da, avšak u některých genotypů jsou odchylky i větší. Vysvětlení těchto změn nemůže být jen na základě záměn aminokyselin v sekvenci patatinových polypeptidů, ale pravděpodobně i na základě změn v počtu aminokyselin v sekvenci nebo v genotypové variabilitě sacharidových antén. V rámci hodnoceného souboru 29 genotypů vyplývá, že nejvyšší četnost má výskyt isoform první hmotnostní úrovně (u 24 genotypů), druhá se vyskytuje méně (u 17 genotypů) a nejméně třetí hmotnostní úroveň (pouze u 8 genotypů). Zajímavé přitom je to, že např. isoformy třetí hmotnostní úrovně se u souboru planých genotypů vyskytují jen u 2 genotypů (*S. berthaultii* a *S. bulbocastanum*) z 19.

Unikátní výsledky přineslo studium glykosylačních profilů a studium enzymových aktivit patatinů. U netradičních kulturních druhů (resp. vybraných genotypů) *Solanum stenotomum* a *Solanum andigenum* byly nalezeny glykany se složením $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$, které nebyly u patatinů brambor nikdy dříve popsány. Jedná se o glykany, které se běžně vyskytují u savců, a není u nich uvedeno, že jsou imunogenní. Poznatky týkající se glykosylace patatinu mohou být jedním z důležitých ukazatelů pro správný výběr odrůdy (genotypu) s nižším obsahem specifických glykanů, které způsobují potravinové alergie a také pro využití brambor pro výrobu bílkovin s léčivými účinky.

Studiem enzymových aktivit izolovaných patatinů z hlíz netradičních a kulturních druhů brambor byly potvrzeny lipidacylhydrolasová (LAH) aktivita a aktivita cytosolové fosfolipasy A_2 (PLA₂). Obě tyto aktivity jsou dávány do souvislosti s obrannou reakcí hlíz a byly potvrzeny u všech analyzovaných patatinů izolovaných z netradičních i planých druhů brambor. Lipidacylhydrolasová aktivita (nebo také esterasová aktivita) patatinů byla stanovena kvalitativně na polyakrylamidovém gelu po předchozí separaci bílkovin, kdy jejich relativní mobilita se pohybovala v rozpětí od 0,75 do 0,89 s počtem pruhů 1-3 s různou intenzitou a kvantitativně spektrofotometricky. Na této úrovni byly hodnoceny tři typy substrátů *p*-nitrofenyl butyrát, *p*-nitrofenyl laurát a *p*-nitrofenyl stearát navzájem se lišící počtem uhlíků v řetězci. Nejvyšší úroveň aktivity vykazoval substrát *p*-nitrofenyl butyrát. Lipidacylhydrolasová aktivita se s použitím *p*-nitrofenyl butyrátu pohybovala v širokém rozpětí od 2,63 (*S. tuberosum*, odrůda Desirée) do 31,33 (*Solanum sucrense*) $\mu\text{mol}/[\text{min mg}]$.

Jako velmi zajímavý se jeví obzvláště netradiční kulturní druh *Solanum sucrense*. Patatin izolovaný z tohoto genotypu vykazoval jedny z nejvyšších hodnot v relativním zastoupení v celkovém bílkovinném spektru, byla u něj zaznamenána nejvyšší aktivita lipidacylhydrolasy a rovněž je tento druh díky totožné ploidii (zejména EBN) křížitelný s odrůdami kulturního druhu bramboru. Fosfolipasová aktivita (PLA₂) patatinů byla rovněž stanovena spektrofotometricky a nejvyšší aktivita fosfolipasy A₂ byla zaznamenána u planých druhů *Solanum leptophyes* (9,26 μmol/[min. mg]) a *Solanum fendleri* (8,52 μmol/[min. mg]) a netradičních kulturních druhů *Solanum goniocalyx* (9,03 μmol/[min. mg]) a *Solanum stenotomum* (6,91 μmol/[min. mg]). V průběhu měření se potvrdil předpoklad týkající se silné závislosti aktivity na pH prostředí, kdy optimální pH se nachází v rozpětí 7-9. Mimo tyto hodnoty byla zaznamenána minimální či žádná aktivita.

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno testem s použitím ABTS a měření spektrofotometricky. Antioxidační aktivita patatinů byla hodnocena na úrovni nativního izolovaného patatinu a patatinových hydrolyzátů, které byly získány enzymatickým štěpením komerčně dostupnými enzymy trypsinem a alkalasou. Antioxidační aktivita patatinu se pohybovala v rozpětí od 0,03 (*S. andigenum*) do 0,14 (*S. sucrense*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny patatinu. Antioxidační aktivita patatinových štěpů byla dle předpokladu mnohonásobně vyšší. Použity byly dva substráty – trypsin a alkalasa. Hlavní rozdíly mezi těmito enzymy je rozdílná teplota štěpení a specifita štěpení, kdy trypsin je enzym štěpící specificky (štěpí za argininem a lysinem, pokud následující aminokyselinou není prolin), zatímco alkalasa je enzym štěpící nespecificky. Při použití trypsinu jako štěpícího enzymu se antioxidační aktivita pohybovala v rozpětí od 4,3 (*S. tuberosum*, Desirée) do 42,8 (*S. sucrense*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny štěpů. Při použití alkalasy se antioxidační aktivita pohybovala od 38,3 (*S. chaucha*) do 551,0 (*S. andigenum*) mg kyseliny askorbové na gram sušiny štěpů. Výrazné rozdíly v antioxidační aktivitě patatinů i jejich štěpů jsou zřejmě závislé na změnách v sekvenci aminokyselin, která se u jednotlivých genotypů může lišit. Je však zřejmé, že enzymatická hydrolyza bílkovin může vést ke zlepšení nutričních a dalších vlastností bílkovin a je tedy efektivní metodou pro přípravu aktivních peptidů, které vykazují antioxidační vlastnosti. Zjištěná antioxidační aktivita může mít u kulturního druhu využití v potravinářství jako konzervačních látek, jako doplňku zabraňující oxidaci tuků, nebo jako dochucovadla zvyšující nutriční hodnotu. U netradičních a planých druhů brambor lze využití spatřovat zejména ve šlechtění pro zlepšení vlastností komerčních odrůd. Antioxidační aktivitě patatinových štěpů je potřeba se i nadále věnovat, zejména provést detailní analýzy štěpů a ověřit jejich případné antimikrobiální vlastnosti.

Aminokyselinové složení bílkovin a nutriční hodnota byly hodnoceny ve vybraném souboru netradičních kulturních druhů brambor *Solanum andigenum*, *Solanum goniocalyx*, *Solanum phureja*, *Solanum stenotomum* a kulturního druhu *Solanum tuberosum* odrůda Desirée a to na úrovni sušiny hlíz, celkového proteinu a patatinové frakce. Studie potvrdila vysokou nutriční hodnotu patatinových bílkovin a vysokou kvalitu hlízových bílkovin celkově. Při hodnocení aminokyselinového složení a nutriční hodnoty patatinové frakce bylo nejvyšších hodnot dosaženo u netradičního kulturního genotypu *Solanum goniocalyx*, kdy hodnota indexu esenciálních aminokyselin byla u tohoto genotypu 112,5 % a prokázán byl také příznivý poměr proteinových a neproteinových dusíkatých látek v hlízách. Jako limitujícími aminokyselinami byly u všech genotypů cystein a methionin. Na základě zjištěných výsledků lze označit *Solanum goniocalyx* jako druh se slibným potenciálem pro uplatnění ve šlechtění rostlin a ve výživě člověka i zvířat.

Zjištěné informace lze zhodnotit ve šlechtění a biotechnologických aplikacích, kdy netradiční a plané druhy nabízí široké rozpětí aktivit a vlastností patatinu. Netradiční a plané druhy brambor mohou zvyšovat variabilitu obsahu bílkovin a jejich frakcí v hlízách oproti genotypům *Solanum tuberosum*. Ve studiu bílkovinných frakcí netradičních a planých druhů bramboru je potřeba i nadále pokračovat. Vhodné by bylo rozšířit studovaný soubor genotypů a zaměřit se zejména na ty, u kterých existuje možnost křížení s kulturním druhem *Solanum tuberosum* a které vykazují znaky podobné odrůdám kulturního druhu.

VI. SEZNAM LITERATURY POUŽITÉ PŘI ŘEŠENÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

- Agrios G. (1997): Plant pathology, 4th edn. Academic Press. San Diego.
- Allen A. K., Bolwell G. P., Brown D. S., Sidebottom C., Slabas A. R. (1996): Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28: 1285-1291.
- Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C. (1995): Marker enrichment and high resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Molecular Genetics and Genomics*, 249: 82-90.
- Barker H., Waterhouse P. M. (1999): The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. In: Smith H. G. and Barker H. (eds) *The Luteoviridae*. CAB International, Wallingford.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. (1990): Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 224: 177-182.
- Barrientos M., Mol E., Peruzzo A., Contreras A., Alberdi M. (1994): Responses to cold of Chilean wild *Solanum* species. *Environmental and Experimental Botany*, 34: 47-54.
- Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, p. 116.
- Bárta J., Bártová V. (2008): Patatin, the Major Protein of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers, and its Occurrence as Genotype Effect: Processing Versus Table Potatoes. *Czech Journal of Food Sciences*, 26: 347-359.
- Bárta J., Bártová V., Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT, České Budějovice, 115 p.
- Bárta J., Čurn V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam, *Chemické listy*, 98: 373-378.
- Bártová V., Bárta J., Kamenová A., Staňková A., Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.). *Chemické listy*, 106: 365-372.
- Baudo M. M., Meza-Zepeda L. A., Palva E. T., Heino P. (1996): Induction of homologous low temperature and ABA-responsive genes in frost-resistant (*Solanum commersonii*) and frost-sensitive (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) potato species. *Plant Molecular Biology*, 30: 331-336.
- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D. C. (1999): The *Rx* Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. *American Society of Plant Physiologists*, 11(5): 781-791.
- Bradshaw J. E., Mackay G. R. (1994): Breeding strategies for clonally propagates potatoes. in *Potato Genetics*, CAB International Wallingford, p. 552.
- Brigneti G., Garcia-Mas J., Baulcombe D. C. (1997): Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Rysto* in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:198-203.
- Brodie B. B., Evans K., Franco J. (1993): Nematode Parasites of Potatoes. pp 87-132 in: Evans K., Trudgill D. L., Webster J. M. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International, Wallingford, England.
- Brown C. R., Thomas P. E (1994): Resistance to potato leafroll virus derived from *Solanum chacoense*: characterization and inheritance. *Euphytica*, 74: 51-57.
- Bukasov S. M. 1971. Cultivated potato species. In S. M. Bukasov [ed.], *Flora of cultivated plants*, vol. IX, 5-40. Kolos, Leningrad, Russia.

- Candido E. de S., Pinto M. F. S., Pelegrini P. B., Lima T. B., Silva O. N., Pogue R., Grossi-de-Sáa M. F., Franco O. L. (2011): Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FABES Journal*, 25: 1-16.
- Carputo D., Barone A. (2005): Ploidy level manipulations in potato through sexual hybridisation. *Annals of Applied Biology*, 146: 71-79.
- Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastano A., Fruscianta L., Peloquin S. J. (1997): Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (22): 12013-12017.
- Cenzano A., Cantoro R., Racagni G., De Los Santos-Briones C., Hernandez-Sotomayor T., Abdala G. (2008): Phospholipid and phospholipase changes by jasmonic acid during stolon to tuber transition of potato. *Plant Growth Regulation*, 56: 307-316.
- Clausen A. M., Okada K. A. (1990): Tuber protein electrophoresis in wild tuberous *Solanum* species. *Darwiniana (san Isidro)*, 30: 163-170.
- Colon L. T., Budding D. J. (1988): Resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in ten wild *Solanum* species. *Euphytica Supplement*, 77-86.
- Cribb P., Hawkes J. G. J. (1986): Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies *andigena*. In W. G. D'Arcy [ed.], *Solanaceae: biology and systematics*, 384-404. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- De Jong W., Forsyth A., Leister D., Gebhardt C., Baulcombe D. C. (1997): A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 153-162.
- Desborough S. L., Peloquin S. J. (1967): Esterase isozymes from *Solanum* tubers. *Phytochemistry*, 6: 989-994.
- Desborough S. L., Peloquin S. J. (1968): Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *American Potato Journal*, 45: 220-229.
- Domkářová J. a Horáčková V. (2013): Uplatnění české genové banky bramboru ve výzkumu a šlechtění. Šlechtitelské listy – jaro 2013. Družstvo vlastníků odrůd.
- Fernandez M. B., Pagano G. R., Daleo G. R., Guevara M. G. (2012): Hydrophobic proteins secreted into the apoplast may contribute to resistance against *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60: 59-66.
- Gambutì A., Rinaldi A., Moio L. (2012): Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology*, 235: 753-765.
- Gebhardt C., Valkonen J. P. (2001): Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology*, 39:79-102.
- Greplová M., Polzerová H., Domkářová J. (2008): Metodika fúze protoplastů elektrickým polem (u rodu *Solanum*). Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. dostupné na <http://www.vubhb.cz/cs/metodika-fuze-protoplastu-elektrickym-polem>.
- Greplová M., Polzerová H., Domkářová J. (2008): Metodika mitotické polyploidizace in vitro (u rodu *Solanum*). Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. dostupné na <http://www.vubhb.cz/cs/metodika-mitoticke-polyploidizace-in-vitro>.
- Grierson C., Du J. S., de Torres Zabala M., Beggs K., Smith C., Holdsworth M., Bevan M. W. (1994). Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant Journal*, 5: 815-826.
- Hämäläinen J. H., Kekarainen T., Gebhardt Ch., Watanabe K. N., Valkonen J. P. T. (2000): Recessive and Dominant Genes Interfere with the Vascular Transport of *Potato virus A* in Diploid Potatoes. *Molecular plant-Microbe interaction*, 13(4): 402-412.
- Hawkes J. G. (1978): Biosystematic of the potato. In *The Potato Crop: The Scientific Basic of Improvement*, ed. P. M Harris, p. 15-69, London: Chapman and Hall.

- Hawkes J. G. (1994): Origins of cultivated potatoes and species relationships, in *Potato Genetics*, CAB International Wallingford, p. 3-42.
- Hijmans R. J., Spooner D. M. (2001): Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, 88(11): 2101-2112.
- Hijmans R. J., Jacobs M., Bamberg J. B., Spooner D. (2003): Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity of taxonomic, geographic, and ecological factors. *Euphytica*, 130(1): 47-59.
- Hodkson W. (1961): Laboratory testing of the potato for partial resistance to *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal*, 38: 261-264.
- Holková I., Bezáčková L., Vanko M., Bilka F., Obložinský M. (2009): Lipoxygenázy a ich význam v biochemických procesoch v rastlinných organizmech. *Chemické listy*, 103: 487-495.
- Hosaka K., Matsubayashi M. (1983b): Studies on the phylogenetic relationships in tuberous Solanums by isozyme analysis. III. Inter-specific differences between each of four cultivated diploid species. *Report Society of Crop Science Breeding, Kinki*, 28: 28-32.
- Hosaka K., Matsubayashi M. (1983a): Studies on the phylogenetic relationships in tuberous Solanums by isozyme analysis. II. Phylogenetic relationships between Mexican and South American diploid species. *Science Report of Faculty of Agriculture Kobe University*, 15: 217-228.
- Huamán Z. (1986): *Systematic Botany and Morphology of the Potato*. International Potato Center, Technical Information Bulletin 6, p. 22.
- Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. (1996): Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2619-2623.
- Chen H., Rosin F. M., Prat S., Hannapel D. J. (2003): Interacting transcription factors from the TALE superclass regulate tuber formation. *Plant Physiology*, 132: 1391-1404.
- Jensen K., Tygesen T.K., Kesmir C., Skovgaard I.M., Sondergaard I. (1997): Classification of Potato Varieties Using Isoelectrophoretic Focusing Patterns, Neural Nets, and Statistical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1): 158-161.
- Jiménez M., Escribano J., Pérez-Gilabert M., Chazarra S., Cabanes J., García-Carmona F. (2001): An octaethylene glycol monododecyl ether-based mixed micellar assay for determining the lipid acyl hydrolase activity of patatin. *Lipids*, 36: 1169-1173.
- Jiménez-Atiénzar M., Cabanes J., Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F., Pérez-Gilabert M. (2003): Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Journal of Lipid*, 38(6): 677-82.
- Jin L. P., Qu D. Y., Xie K. Y., Bian C. S., Duan G. S. (2004): *Potato Germplasm, Breeding Studies in China*, Kunming, China, p. 175-178.
- Jongsma M. A., Bakker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J. (1995): Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8041-8045.
- Joosten M. H., De Wit P. J. (1989): Identification of Several Pathogenesis-Related Proteins in Tomato Leaves Inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-Glucanases and Chitinases. *Plant Physiology*, 89(3): 945-951.
- Jorgensen M., Bauw G., Welinder K. G. (2006): Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25): 9389-97.
- Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. A., Valkonen J. P. T., Gebhardt C., Watanabe K. N. (2000): Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 43: 1-8.

- Katsube T., Kang I. J., Takenaka Y., Adachi M., Maruyama N., Morisaki T., Utsumi S. (1998): N-glycosylation does not affect assembly and targeting of proglycinin in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379: 107-117.
- Kermode A. R., Bewley J. D. (1999): Synthesis, processing and deposition of seed proteins: The pathway of protein synthesis and deposition in the cell. *Seed Proteins*, 807-841.
- Kessler A., Baldwin I. T. (2002): Plant responses to insect and herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 299–328.
- Kong B., Xiong Y. L. (2006): Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6059-6068.
- Koningsveld van G. A., Gruppen H., Jongh de H. H. J., Wijngaards G., Boekel van M. A. J. S., Waltra P., Voragen A. G. J. (2002): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and variol additives, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82: 134-142.
- Koningsveld van G. A., Walstra P., Voragen A. G., Kuijpers I. J., van Boekel M. A., Gruppen H. (2006): Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17): 6419-6427.
- Kosier T., Desborough S. L. (1981): Isolation of some predominate tuber proteins of potato. *Plant Physiology*, 67: 92.
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M. (2005): Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické listy*, 99: 474-482.
- Lee L., Hannapel D., Mignery G., Shumway J., Park W. (1983): Control of tuber protein synthesis in potato. In: Goldberg R. B. (ed.): *Plant Molecular Biology*. UCLA Symposium, Alan R. Liss, New York: 355–365.
- Lee S. K., Ye Y. M., Yoon S. H., Lee B. O., Kim S. H. Park H. S. (2006): Evaluation of the sensitization rates and identification of IgE-binding components in wild and genetically modified potatoes in patients with allergic disorders. *Clinical and Molecular Allergy*, 4: 1 – 10.
- Leonards-Shippers C., Gieffers W., Salamini F. and Gebhardt C. (1992): The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Molecular and General Genetics*, 233: 278–283.
- Logemann J., Mayer J. E., Schell J., and Willmitzer L. (1988): Differential expression of genes in potato tubers after wounding. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 1136-1140.
- Macrae A. R., Visicchion J. E., Lanot A. (1998): Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75: 1489-1494.
- Majamaa H., Seppälä U., Palosuo T., Turjanmaa K., Kalkkinen N., Reunala T. (2001): Positive skin and oral challenge responses to potato and occurrence of immunoglobulin E antibodies to patatin (Sol t 1) in infants with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy Immunology*, 12: 283 – 288.
- Malcolmson J. (1969) Factors involved in resistance to blight (*Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) in potatoes and assessment of resistance using detached leaves. *Annals of Applied Biology*, 64: 461-468.
- Mann S. K., Brown J. M., Briscoe C., Parent C., Pitt G., Devreotes P. N., Firtel R. A. (1997): Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in *Dictyostelium*. *Developmental Biology*, 183(2): 208-221.
- Manosalva P., Torres S., Trognitz F., Gysin R., Nino-Liu D., Simon R., Herrera M., Perez W.,

- Landeo J., Trognitz B., Ghislain M., Nelson R. (2001): Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight. *Scientist and Farmer: partners in research for the 21st century*. Program Report 1999-2000, International Potato Center, Lima, 27-37.
- Marczewski W., Flis B., Syller B., Schäfer-Pregl R., Gebhart C. (2001): A major quantitative trait locus for resistance to potato leafroll virus is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to n-gene-like markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 1420–1425.
- Marshall J., Sidebottom C., Debet M., Martin C., Smith A. M., Edwards A. (1996): Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell*, 8: 1121-1135.
- Matos A. R., Pham-Thi A. T. (2009): Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 491-503.
- Mignery G. A., Pikaard C. S., Park W. D. (1988): Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene*, 62: 27-44.
- Mignery G. A., Pikaard C. S., Hannapel D. J., Park W. D. (1984): Isolation and sequence analysis of cDNAs for the major potato tuber protein, patatin. *Nucleic Acids Research*, 12(21): 7987-8000.
- Millam S., Payne L. A., Mackay G. R. (1995): The integration of protoplast fusion-derived material into potato breeding programme. A review of progress and problems. *Euphytica*, 85: 451-455.
- Mine Y., Li-Chan E., Jiang B. (2010): *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraaceuticals*. Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, p. 420.
- Naaser W., Tapia de M., Burkard G. (1990): Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1,3- β -glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36: 1-14.
- Niederhauser J. S. (1989): *Phytophthora infestans*. The Mexican connection. In: Lucas J. A., Shattock R. C., Shaw D. S., Cooke L. R. (eds.): *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, 25–45.
- Paiva E., Lister R. M., Park W. D. (1983): Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. *Plant Physiology*, 71: 161–168.
- Park W., Blackwood C., Mignery A., Hermodson M. A., Lister R. M. (1983): Analysis of the heterogeneity of the 40,000 molecular weight tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and NH₂-terminal sequence analysis. *Plant Physiology*, 71: 156-160.
- Partington J. C., Smith C., Bolwell G. P. (1999): Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue. *Planta*, 207(3): 449-460.
- Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. (2004): Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *IN VITRO*. *Chemické listy*, 98: 174-179.
- Pehu E., Gibson R. W., Jones M. G. K., Karp A. (1990) Studies on the genetic basis of resistance to Potato Leaf Roll Virus, Potato Virus Y and Potato Virus X in *Solanum brevidens* using somatic hybrids of *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Plant Science*, 69: 95-101.
- Pérez W., Salas A., Raymundo R., Huamán Z., Nelson R., Bonierbale M. (2000): Evaluation of wild potato species for resistance to late blight. CIP Program Report 1999–2000. *Research on Potato*, Lima, 49–62.
- Perla V., Jayanty S. S., Homl D. G., Davidson R. D. (2014): Relationship between Tuber Storage Proteins and Tuber Powdery Scab Resistance in Potato. *American Journal of Potato Research*, 91: 233-245.

- Peyer C., Boney P., Staudacher E. (2004): Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochemica et Biophysica Acta*, 1672: 27–35.
- Pineda O., Bonierbale M. W., Plaisted R. L., Brodie B. B., Tanksley S. D. (1993): Identification of RFLP markers linked to the H1 gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Geonome*, 36: 152–156.
- Polkowska-Kowalczyk L., Wielgat B., Maciejewska U. (2011): Involvement of phospholipase A2 in the response of *Solanum* species to an elicitor from *Phytophthora infestans*. *Acta physiologiae plantarum*, 33: 2521-2531.
- Porta H., Rocha-Sosa M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 161: 913-920.
- Pots A. M., Gruppen H., Diepenbeek Van R., Lee Van Der J. J., Boekel Van M. A. J. S., Wijngaards G., Voragen A. G. J. (1999): The effect of storage of whole protein of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content, a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79: 1557-1564.
- Povreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek Van Den L. A. M., Koningsveld Van G. A., Voragen A. G. J. (2001): Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2864-2874.
- Prosevičius J., Staševski Z., Tiunaitiene N., Ganusauskiene R. (1998): Interspecific somatic hybridization between potato *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Biologija*, 1: 68-71.
- Racusen D. (1988): Patatin in wild species of *Solanum*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 727-729.
- Racusen D., Foote M. (1980): A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry*, 4: 43-52.
- Racusen D., Racusen R. (1992): Esterase activity and structural heterogeneity in patatin from a wild potato species. *Canadian Journal of Botany*, 70: 597-600.
- Ralet M. CH., Guéguen J. (2001): Foaming Properties of Potato Raw Proteins and Isolated Fractions. *Food Science and Technology*, 34(4): 266-269.
- Rauscher G. M., Smart C. D., Simko I., Bonierbale M., Mayton H., Greenland A., Fry W. E. (2006): Characterization and mapping of *Rpi-ber*, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 674-687.
- Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L. (2005): Antioxidant Capacity, Anthocyanins and Total Phenolics in Purple- and Red-Fleshed Potato (*Solanum tuberosum* L.) Genotypes. *American Journal of Potato Research*, 82: 271-277.
- Rickeman V. S., Desborough S. L. (1978): Inheritance of three electrophoretically determined protein bands in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 52: 187-90.
- Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W., Stratmann M., Schell J., Willmitzer L. (1989): Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class 1 patatin gene. *The EMBO Journal*, 8: 23-29.
- Rosahl S., Schmidt R., Schnell J., Willmitzer L. (1986): Isolation and characterization of gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tubers. *Molecular Genetic & Genomic*, 203: 114-220.
- Ross H. (1986): Potato breeding – problems and perspectives. *Journal of Plant Breeding*, Supplement 13, p. 132.
- Sakaki T., Kato T., Saji H. (2007): Lipid acyl-hydrolase in leaves of different kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars: Purification and characterization of a kidney bean lipid acyl-hydrolase, and foliar lipid changes in the cultivars with ozone exposure. *Plant*

- Science, 172: 462-472.
- Sandbrink J. M., Colon L. T., Wolters P. J. C. C., Stiekema W. J. (2000): Two related genotypes of *Solanum microdontum* carry different segregating alleles for field resistance to *Phytophthora infestans*. *Molecular Breeding*, 6: 215–225.
- Selitreffnikoff C. P. (2001): Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2883–2894.
- Senda K., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appear to be patatin. *Plant Cell Physiology*, 37(3): 347-353.
- Seppälä U., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T., Polosuo, T., Kalkkinen, N. (1999): Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato, *Journal of Allergy and Clin. Immunology*, 103: 165-171.
- Sharma N., Gruszewski H. A., Park S. W., Holm D. G., Vivanco J. M. (2004): Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 647-655.
- Shewry P. R. (2003): Tuber Storage Proteins. *Annals of Botany*, 91: 755-769.
- Scherer G. F. E., Ryu S. B., Wang X., Matos A. R., Heitz T. (2010): Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in Plant Science*, 15(12): 693-700.
- Singh J., Kaur L. (2009): *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Elsevier Inc., p. 99-108.
- Singh P. (2011): Antioxidant activity of food proteins and food protein hydrolysates. A thesis submitted to McGill University in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, p. 89.
- Smilde W. D., Brigneti G., Jagger L., Perkins S., Jones J. D. (2005): *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 252-258.
- Sonnewald U., Studer D., Rocha-Sosa M., Willmitzer L. (1989): Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Planta*, 178: 176-183.
- Spooner D. M., Douches D., Contreras A. (1992): Allozyme variation within *Solanum* sect. *Petota*, ser. *Etuberosa* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 79: 467-471.
- Spooner D. M., Salas A. (2006): Structure, biosystematics, and genetic resources. In: J. Gopal and S. M. P. Khurena (eds.) *Handbook of potato production, improvement, and post-harvested management*. Haworth's Press, Inc. Binghampton, New York, p. 1-39.
- Stewart H. E., Flavelle P. H., McCalmont D. C., Wastie R. L. (1983): Correlation between glasshouse and field tests for resistance to foliage blight caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 26: 41-48.
- Stiekma W. J., Heidekamp F., Dirkse W. G., Beckhum van J., deHaar J., Bosch ten C., Louwerae J. D. (1988) : Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11: 255-269.
- Strickland J. A., Orr G. L., Walsh T. A. (1995): Inhibition of *Diabrotica* Larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiology*, 109: 667-674.
- Stupar R. M., Beaubien K. A., Jin W., Song J., Lee M. K., Wu CH., Zhang H. B., Han B., Jiang J. (2006): Structural Diversity and Differential Transcription of the Patatin Multicopy Gene Family During Potato Tuber Development. *Genetics*, 172(2): 1263-1275.
- Swiezynski K. M., Dziewonska M. A., Ostrowska K. (1989): Resistance to the potato leafroll virus (PLVR) in diploid potatoes. *Plant Breeding*, 103: 221–227.
- Tai G. C. C., Xiong X. (2005) Ploidy manipulation – examination of gene action and method of gene mapping. In: Razdan MK, Mattoo AK (Eds.): *Genetic improvement of Solanaceuos crops Vol 1: Potato*, Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA: 143-164.
- Tonón C., Daleo G., Oliva C. (2001): An acid beta-1,3 glucanase from potato tubers appears

- to be patatin, *Plant Physiology and Biochemistry*, 93(10) : 849-854.
- Toxopeus H. J. (1964): Treasure-digging for blight resistance in potatoes. *Euphytica*, 13: 206-222.
- Uhrig H., Gebhardt C., Tacke E., Rohde W., Salamini F. (1992): Recent advances in breeding potatoes for disease resistance. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98: 193-210.
- Vayde M. E. (1994): Environmental stress and its impact on potato yield. In: Bradshaw J. E., Mackey G. R. (eds.): *Potato Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 239–263.
- Villamon F. G., Spooner D. M., Orrillo M., Mihovilovich E., Pérez W., Bonierbale M. (2005): Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucissectum* (series Piurana). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(6): 1201-1214.
- Vleeshouwers V. G. A. A., van Dooijeweert W., Keizer L. C. P., Sijpkens L., Govers F., Colon L. T. (1999): A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 241-250.
- Vokál a kolektiv (2013): *Brambory. Šlechtění, pěstování, užití, ekonomika*. Profi Press s.r.o., Praha, p. 160.
- Voort J. R., Konstantin, Kanyuka K., Vossen E., Bendahmane A., Mooijman P., Klein-Lankhorst R., Stiekema W., Baulcombe D., Bakker J. (1999): Tight Physical Linkage of the Nematode Resistance Gene *Gpa2* and the Virus Resistance Gene *Rx* on a Single Segment Introgressed from the Wild Species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into Cultivated Potato. *Molecular plant – Microbe interaction*, 12(3): 197-206.
- Voort J. R., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., Zandvoort von P., Vinkle H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J. (1997): Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 874-880.
- Vossen E. A., Voort J. N., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D. C., Bakker J., Stiekema W. J., Klein-Lankhorst R. M. (2000): Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal*, 23(5): 567-576.
- Vyšniauskiene R. (2004): Some evidence regarding chloroplast proteins of frost resistant hybrids of potato. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676: 261-265.
- Wang J. S., Zhao M. M., Zhao Q. Z., Jiang Y. M. (2007): Antioxidant properties of papatin hydrolysates of wheat gluten in different oxidation system. *Food Chemistry*, 101: 1658-1663.
- Wang L., Xiong Y. L. (2005): Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9186-9192.
- Zhang N., Kallis R. P., Ewy G. R., Portis A. R. (2002): Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of larger rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences*, 99: 3330-3334.
- Zimnoch-Guzowska E., Marczevski W., Lebecka R., Flis B., Schafer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. (2000): QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Science*, 40: 1156–1167.
- Zourelidou M., de Torres-Zabala M, Smith C., Bevan M. W. (2002): Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The plant Journal*, 30(4): 489-497.