

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

---

**Studijní program:** Zemědělské inženýrství

**Studijní obor:** Všeobecné zemědělství

**Katedra:** Rostlinné výroby

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hodnocení variability proteinů mezi orgány druhu

*Solanum tuberosum* L.

Vedoucí diplomové práce:  
**Ing. Jan Bárta, Ph.D.**

Autor:  
**Michaela Vavrušková**

---

2007

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Českých Budějovicích, dne 22. dubna 2007

.....

podpis

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Janu Bártovi Ph.D., za poskytnutí informací a odborné vedení při práci a Ing. Veronice Heřmanové za odborné vedení při práci v laboratoři i při zpracování výsledků a za cenné rady, kterými tuto práci provázeli.

## OBSAH:

1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ ČÁST .....	8
2. 1. CHARAKTERISTIKA DRUHU – BRAMBOR HLÍZNATÝ (SOLANUM TUBEROSUM L.).....	8
2. 2. CHARAKTERISTIKA HLÍZOVÝCH PROTEINŮ .....	8
2. 3. CHARAKTERISTIKA N-LÁTEK V OSTATNÍCH ORGÁNECH BRAMBORU HLÍZNATÉHO .....	12
2. 4. VÝVOJ, RŮST A ZMĚNY V CHEMICKÉ SLOŽENÍ BRAMBOROVÉ HLÍZY .....	13
2. 4. 1. <i>Růst a vývoj brambor</i> .....	13
2. 4. 2. <i>Změny kvality hlíz v závislosti na vývoji</i> .....	15
2. 4. 3. <i>Význam a působení dusíkatého hnojení na vnější a vnitřní kvalitu hlíz</i> .....	17
2. 5. VLASTNOSTI PROTEINŮ A METODY POUŽÍVANÉ PŘI JEJICH ANALÝZE .....	18
2. 5. 1. <i>Vlastnosti proteinů umožňující jejich analýzu</i> .....	18
2. 5. 2. <i>Lyofilizace</i> .....	18
2. 5. 3. <i>Metody analýzy proteinů</i> .....	19
3. CÍL PRÁCE.....	23
4. MATERIÁL A METODY .....	24
4. 2. <i>Metody</i> .....	25
4. 2. 1. <i>Polní pokus</i> .....	25
4. 2. 2. <i>Odběr vzorků z jednotlivých vrstev hlízy</i> .....	29
4. 2. 3. <i>Odběr vzorků rostlin</i> .....	29
4. 2. 4. <i>Charakterizace hlízových proteinů pomocí elektroforézy SDS-PAGE</i> .....	30
4. 2. 5. <i>Stanovení obsahu bílkovin v hlízách (čistých bílkovin)</i> .....	32
4. 2. 6. <i>Stanovení obsahu celkového dusíku v hlízách (hrubých bílkovin)</i> .....	32
4. 2. 7. <i>Průměrná hmotnost hlíz</i> .....	33
4. 2. 8. <i>Obsah sušiny</i> .....	33
4. 2. 9. <i>Statistické zpracování dat</i> .....	33
5. VÝSLEDKY .....	34
5. 1. <i>Proteinové profily jednotlivých vrstev hlízy - vyhodnocení elektroforeogramů</i> .....	34
5. 2. <i>Proteinové profily hlíz v průběhu vegetace - vyhodnocení elektroforeogramů</i> .....	36
5. 3. <i>Stanovení obsahu proteinů v ostatních orgánech rostliny brambor</i> .....	37
5. 4. <i>Stanovení obsahu proteinů v hlízách (obsah čistých proteinů)</i> .....	38
5. 5. <i>Stanovení obsahu celkového dusíku v hlízách (N-látky)</i> .....	39
5. 6. <i>Obsah sušiny hlíz</i> .....	40
5. 7. <i>Průměrná hmotnost hlíz</i> .....	41
5. 8. <i>Vztahy mezi jednotlivými parametry hlíz</i> .....	42
6. DISKUZE.....	45
6. 1. <i>Proteinové profily jednotlivých vrstev hlízy - vyhodnocení elektroforeogramů</i> .....	45
6. 2. <i>Proteinové profily hlíz v průběhu vegetace - vyhodnocení elektroforeogramů</i> .....	45
6. 3. <i>Stanovení obsahu proteinů v ostatních orgánech rostliny brambor</i> .....	46
6. 4. <i>Obsah N-látek a obsah bílkovin v hlíze</i> .....	46
6. 5. <i>Obsah sušiny hlíz</i> .....	47
6. 6. <i>Průměrná hmotnost hlíz</i> .....	48
7. ZÁVĚR.....	50
8. LITERATURA.....	51
SEZNAM TABULEK.....	53
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	58

# 1. ÚVOD

Hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum Tuberosum* L.) jsou obecně považovány za rostlinný produkt mající význam hlavně v lidské výživě a pro zpracovatelský průmysl (BÁRTA, ČURN 2004). Hodnota bramborových hlíz je pro všechny směry jejich užití i zpracování dána jejich chemickým složením (RYBÁČEK et al. 1988). Ve výživě obyvatel plní brambory funkci objemnou – dostatečný objem potravy pro zátěž trávicího ústrojí; sytící – vhodný obsah sacharidové složky a funkci ochrannou – vhodný obsah vitamínů a minerálních látek (MINX et al. 1994).

Jak v lidské výživě, tak i ve zpracovatelském průmyslu je význam bramborové hlízy spojen s obsahem škrobu jako hlavní zásobní látkou v hlíze. Význam dusíkatých látek včetně proteinů je pro jejich poměrně nízký obsah v čerstvé hmotě konzumentem často opomíjen (BÁRTA, ČURN 2004). Přesto, bramborové proteiny patří mezi nutričně nejhodnotnější proteiny rostlinného původu (DESBOROUGH 1985).

Proteiny jsou významnou složkou bramborové hlízy i přes jejich nízkou koncentraci - v čerstvé hmotě hlíz cca 2 % , kolem 10 % v sušině hlíz (DEBRE, BRINDZA 1996). Největší podíl proteinů hlíz představují patatin a inhibitory proteáz. Obě složky jsou považovány za zásobní bílkoviny hlíz, ale disponují i významnými biologickými aktivitami, spojenými s obranným systémem rostliny (BÁRTA, ČURN 2004).

Množství proteinů i ostatní obsahových látek je různý v jednotlivých vrstvách hlízy bramboru (ŠPALDOŇ 1982) a jejich obsah se v hlíze mění v průběhu vegetace (KOLBE, STEPHAN- BECKMANN 1997). Obsah proteinů je dále závislý na odrůdě, podmínkách prostředí doprovázejících pěstování a výživě rostlin (SHEWRY 2003).

Všechny tyto změny v proteinovém složení nám umožňují sledovat poměrně nové a jednoduché elektroforetické techniky. Elektroforetické metody jsou příbuznou skupinou technik používaných především pro analýzu proteinů a nukleových kyselin a jsou založeny na nestejně pohyblivosti elektricky nabitých částic v elektrickém poli (ANDREWS 1993).

## **2. LITERÁRNÍ ČÁST**

### **2. 1. Charakteristika druhu – Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.)**

Ze všech kulturních plodin má brambor nejbohatší genetické zdroje. Brambor má dvě centra biodiverzity: tzv. andské centrum v okolí jezera Titicaca, kde rostou genotypy adaptované na podmínky krátkého dne, a chilské centrum s adaptací na dlouhý den. Z chilského centra patrně pochází předchůdci evropských kulturních odrůd. Názory na původ kulturních brambor jsou různé. Většina autorů se shoduje v tom, že kulturní tetraploidní formy ( $2n = 48$ ) vznikly buď křížením, nebo mutací z planě rostoucích diploidních forem ( $2n = 24$ ), z nichž se vyvinul pěstovaný druh *Solanum andigenum* ( $2n = 48$ ) a hybridizací mezi jeho formami vznikl druh *Solanum tuberosum* ( $2n = 48$ ) (GRAMAN 1996, ONDŘEJ 1992).

Historie pěstování brambor je již dávno spojena s kulturou člověka – uplatnění druhu *Solanum* jako hlavní potraviny obyvatel And bylo prokázáno již 2000 let před příchodem španělů. Na území Čech jsou zaznamenány zápisy o polním pěstování brambor až z poloviny 17. století (JŮZL 2000). V současné době zaujímají sklizňové plochy brambor v České Republice plochu kolem 45 000 ha (VOKÁL 2005).

### **2. 2. Charakteristika hlízových proteinů**

Hlízové proteiny tvoří s aminokyselinami, amidy, různými bázemi a anorganickými sloučeninami komplex dusíkatých látek bramborových hlíz. Z biologického hlediska představují jedny z nejhodnotnějších proteinů rostlinného původu a svou kvalitou se přibližuje kvalitě vaječné bílkoviny (RYBÁČEK et al. 1988).

Obsah proteinů je samozřejmě závislý na odrůdě, podmínkách prostředí doprovázejících pěstování a výživě rostlin (SHEWRY 2003). Obvykle se pohybuje kolem 2% v čerstvé hmotě a 10 % v sušině (DEBRE, BRINDZA 1996).

Hnojení dusíkem zvyšuje v bramborových hlízách obsah celkového dusíku a obsah bílkovinného dusíku, i když při velmi vysokých dávkách N může dojít ke stresu rostliny, který má naopak za následek pokles množství bramborové bílkoviny (TALAAT 2003).

### **Zásobní proteiny *Solanum tuberosum* L.**

Proteiny brambor nejsou homogenní složkou. Jsou tvořeny zhruba ze 70% globulinem (tuberin) a ze 30% albuminem (tuberinin). Hlavní složku celkového rozpustného proteinu zralé hlízy bramboru je skupina glykoproteinů s triviální názvem patatin. Skupina příbuzných glykoproteinů s molekulární hmotností okolo 40 kD je nalézána ve všech kultivarech brambor podrobených analýze proteinů (SDS-PAGE) (BÁRTA, ČURN 2004).

Patatin tvoří ve zralých hlízách 30 - 40% z celkového vodou rozpustného proteinu hlíz (JIMENEZ et al. 2002, RYDEL et al. 2003), ale POTS et al. (1999) uvedli ještě vyšší podíl – až 60 %.

Spektrum hlízových proteinů lze členit na tři hlavní skupiny (POTS et al. 1999) :

- patatin neboli patatinový komplex či rodina patatinových proteinů
- bramborové inhibitory proteáz
- ostatní proteiny, hlavně proteiny s enzymovou účastí na syntéze škrobu

### **Základní charakteristika patatinu**

Patatinový komplex představuje skupinu imunologicky identických glykoproteinů s původně zjištěnou molekulovou hmotností 40 kDa. Dalším studiem bylo zjištěno, že patatin je pravděpodobně in vivo syntetizován jako "větší" prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa s následným odštěpením signálního peptidu, který je tvořen 23 aminokyselinami (MIGNERY et al. 1984).

Patatin je považován za dimer (nativní forma) s přibližnou molekulovou hmotností 88 kDa (BÁRTA, ČURN 2004).

Navázání sacharidové části na proteinovou část molekuly je uskutečněno prostřednictvím dvou zbytků asparaginu. Podíl sacharidové části představuje asi 4 % z relativní hmotnosti makromolekuly (POTS et al. 1998).

Přestože jsou jednotlivé isoformy patatinu imunologicky identické, byla mezi nimi na úrovni odrůd zjištěna nábojová heterogenita. Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových isoform. Isoformy patatinu byly rozděleny do čtyř skupin A, B, C, D, přičemž isoforma A zaujímá 62%, isoforma B 26% a isoformy C a D zaujímají 5% a 7% (BÁRTA 1997).

### **Fyziologické vlastnosti patatinu**

Patatin je v hlízách brambor považován za hlavní zásobní protein a je uložen ve vakuolách parenchymu (HIRSCHBERG et al. 2001; BÁRTA, ČURN 2004). V průběhu skladování hlíz a při jejich klíčení dochází k postupnému snižování obsahu patatinových proteinů, což logicky potvrzuje funkci zásobního proteinu (POTS et al. 1999). Úloha zásobního proteinu není patrně jediná fyziologická role patatinu. Patatinu byla také připsána aktivita kyselého  $\beta$ -1,3-glukanasy. Ta obecně přispívá k obraně rostlin proti houbovým patogenům hydrolýzou  $\beta$ -1,3-glukanů buněčných stěn hyf (BÁRTA, ČURN 2004).

U patatinu byla také zjištěna významná antioxidační aktivita mezi antioxidačními látkami brambor je významem řazen na druhé místo za kyselinu askorbovou (AL-SAIKHAN et al. 1995). Byla prokázána alergenní schopnost patatinu. Alergenicitu patatinu je snižována tepelnou úpravou brambor, nikoliv však jako následek jeho denaturace, ale spíše jako následek agregace s ostatními hlízovými proteiny (SEPPALA et al. 1999)

### **Enzymová aktivita**

Patatin je zřejmě významným faktorem obranyschopnosti rostlin. Vede k tomu především objev jeho široké hydrolázové aktivity.

U patatinu byla současně objevena aktivita tří hydroláz:

1. nescifické lipid acyl hydrolázy (RACUSEN 1984)
2.  $\beta$ -1,3-glukanazy (TONÓN et al. 2001)
3. cytosolová fosfolipáza A2 (SENDA et al. 1996)

### **Bramborové inhibitory proteáz**

Z podílu všech vyextrahovaných proteinů představují inhibitory proteáz 20 – 30 % (POTS et al. 1999). Inhibitory proteáz mají u rostlin významnou roli při ochraně rostlin proti patogenům (BÁRTA, ČURN 2004).



Přibližně 40 % všech bramborových inhibitorů proteáz je tvořena inhibitory Kunitzovova typu o  $M_r = 22$  kDa (POUVREAU 2004), druhým typem jsou inhibitori Bowmanova-Birkovaty s  $M_r$  v rozmezí 6-10 kDa. Tyto inhibitory proteáz se hromadí v hlízách brambor jako zásobní bílkoviny (BÁRTA, ČURN 2004).

### **Charakteristika ostatních N-látek v bramborové hlíze**

Nejdůležitějším podílem komplexu dusíkatých látek je čistý protein. Podíl čistého proteinu se v celkovém obsahu dusíku pohybuje okolo 50 % (DEBRE, BRINDZA 1996; MÍČA, VOKÁL 1997), ale může kolísat v rozpětí od 34 do 70 % (LI, SAYRE 1975).

Neproproteinovou složku dusíkatého komplexu představují volné aminokyseliny (15 %), jejich amidy (23 %) a ostatní dusíkaté látky (12 %). Z nich zhruba 4 % tvoří dusičnany (RYBÁČEK et al. 1988). Nutriční hodnota proteinů hlíz je určována zejména aminokyselinovou skladbou.

Vedle aminokyselin, které jsou vázány v bílkovině se v bramborové hlíze vyskytují i volné aminokyseliny. Jedná se o kyselinu glutamovou a asparagovou, a v neposlední řadě jejich amidy glutamin a asparagin (ZRŮST 2004). Pozornost je věnována také obsahu esenciálních aminokyselin. Jako limitující jsou v proteinech hlíz uváděny sирné aminokyseliny (zejména methionin). Potenciálně je také limitující isoleucin. Značný význam má u bramborových proteinů, na rostlinné proteiny, poměrně vysoký obsah lysinu (BÁRTA, ČURN 2004).

### **Rozložení N - látek v bramborové hlíze**

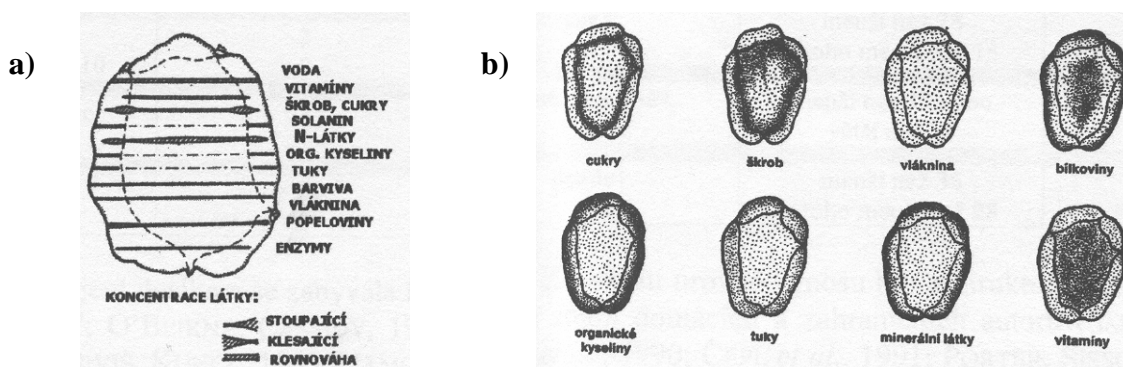
V hlíze je dusík rozložen nestejně, a to v opačném poměru ke škrobu (viz složení hlízy obrázek č. 1). Nejbohatší na dusík jsou buňky pod slupkou a střed hlízy. Kolem kambiálního kruhu v parenchymu, který hromadí škrob, je dusíku nejméně (RYBÁČEK et al. 1988).

MÍČA, VOKÁL (1997) uvádějí, že výrazná část N-látek se nachází v oblasti slupky a v srdéčku. Autoři uvádějí, že podíl bílkovinného dusíku z celkového dusíku je v oblasti slupky 35,5 %, amidů (asparagin a glutamin) 44,7 %, ale v oblasti vnitřní dužniny jsou podíly těchto složek v celkovém dusíku 28,2 % a 71,7 % viz. tabulka č. 1:

**Tabulka č. 1** - Rozdělení jednotlivých frakcí dusíkatých látek v hlíze brambor (podle MÍČA, VOKÁL 1997)

Hmotnost vrstvy z celkové hmotnosti hlízy v %	Slupka	Korová vrstva	Vnější dužnina	Vnitřní dužnina
	5,88	33,01	35,39	25,37
Sušina každé vrstvy v %	15,00	21,07	22,20	17,20
Celkový N	3,54	1,53	1,68	2,21
Bílkovinný N	1,26	0,56	0,57	0,62
Rozpuštěný N	2,70	1,37	1,58	0,16

**Obrázek č. 1** - Schéma přibližného rozložení hlavních látek v bramborové hlíze na příčném (a) a podélném (b) řezu (ŠMÁLIK 1987, RYBÁČEK et al. 1988)



## 2. 3. Charakteristika N-látek v ostatních orgánech bramboru hlíznatého

### Charakteristika N-látek v listech

#### Fytochrom

Jedná se o fotoreverzibilní chromoprotein, který je univerzálně rozšířeným fotoreceptorem a nachází se ve všech rostlinných orgánech (PROCHÁZKA et al. 1998).

Jeho objev H.A.BORTHWICKEM na počátku 50. let minulého století patří k jednomu z největších objevů fyziologie rostlin. Ve svém funkčním stavu se fytochrom vyskytuje jako dimer s molekulovou hmotností 250 kDa. Obsah fytochromu je nejvyšší v mladých, nediferencovaných pletivech a v aktivně rostoucích zónách (PROCHÁZKA et al. 1998).

**Rubisco** (ribulosa-1,6-bisfosfátkarboxylasa)

Jedná se o enzym ze třídy lyas, který ve fotosyntetických reakcích zelených rostlin hraje klíčovou roli. Vytvářejí ho dvě podjednotky, velká a malá. Jde patrně nejhojnější protein na planetě (ANONYM 1 2007).

Během fotosyntézy katalysuje připojení CO<sub>2</sub> k molekule ribulosa-1,5-bisfosfátu. Jeho molekulová hmotnost je 55 kDa (QI-WEN NIU 2006).

## **Charakteristika N-látek v ostatních orgánech *Solanum tuberosum* L.**

### **Glykoalkaloidy**

Bývají často uváděny pod společným názvem solanin. GA byly prokázány ve většině tkání bramboru: listech, stoncích, květech, bobulích, hlízách i klíčkách. Obsah GA v jednotlivých částech rostliny ukazuje tabulka č. 2 (SCHULZOVÁ, HAJŠLOVÁ 1999).

**Tabulka č. 2** - Obsah glykoalkaloidů v rostlině a hlízách (SCHULZOVÁ, HAJŠLOVÁ 1999)

<b>Část rostliny</b>	<b>Typický obsah GA (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Květ</b>	3 000 – 5 000
<b>Stonek</b>	20 – 40
<b>List</b>	400 – 1 000
<b>Kořen</b>	700 – 1 000
<b>matečná hlíza</b>	20 – 200
<b>Klíčky</b>	2 000 – 10 000

## **2. 4. Vývoj, růst a změny v chemické složení bramborové hlízy**

### **2. 4. 1. Růst a vývoj brambor**

Odrůdy brambor se dělí podle délky vegetační doby od výsadby do fyziologické zralosti na velmi rané (do 110 dní), rané (111 – 120 dní), polorané (121 až 130 dní), polopozdní (131 – 145 dní) a pozdní (nad 145 dní) (JŮZL et al. 2000).

V ontogenezi brambor lze pozorovat jednotlivé fáze růstu – na základě rychlosti růstu biomasy jednotlivých orgánů vzhledem k růstu biomasy celé rostliny vyjádřené alometrickými vztahy, stanovili fáze růstu rostliny brambor Raeuber a Engel takto (ZRŮST 1994):

### **Fáze růstu:**

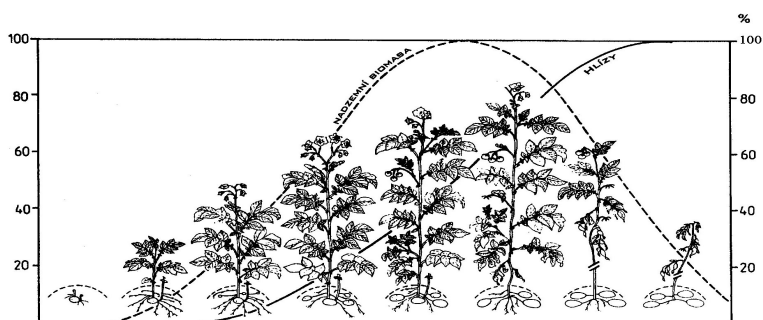
- **0** – růst klíčků a kořenového systému, objevení se prvních listů nad zemí
- **1A** – růst listů, lodyh, kořenů (40 – 60% z hmoty natě) a založení stolonů
- **1B** – růst všech orgánů a nasazení hlíz (20 – 25 dní od vzejití), zakládání květních poupat
- **2** – intenzivní růst orgánů natě, kořenů (zasahujících do hloubky asi 20 až 30cm, ojediněle i do 150cm) a hlíz; počátek květu
- **3** – maximální tvorba biomasy nadzemní části, intenzivní růst hlíz a omezení růstu kořenů
- **4** – pokles hmoty nadzemní části i kořenů a zvětšování biomasy hlíz (za 1 den u velmi raných, u raných a poloraných odrůd se vytvoří až 700kg na 1ha, u polopozdních a pozdních 300 až 500kg)
- **5** – hmotnost biomasy hlíz dosahuje u našich odrůd 63 – 79% z biomasy celé rostliny

Ve fázi 0 – 1 začíná probíhat růst klíčku a kořenové soustavy. Růst klíčku ze začátku zcela závisí na mateřské hlíze a na teplotě, při které klíčení probíhá (6° - 10 °C). Po vzejití se vytvářejí stonky a listy a v zemi vyrůstají stolony, při souběžném mohutném růstu kořenové soustavy. Růst kořenů je zvláště intenzivní v době vzcházení. K nasazování hlíz dochází asi za 20 – 30 dní od vzejití, což zhruba odpovídá zakládání květních poupat. Ve 2. fázi probíhá intenzivní růst natě, kořenů a hlíz. Ve 3. fázi dosahuje hmota nadzemní části maxima, hlízy intenzivně rostou, omezuje se růst kořenů. Ve 4. fázi hmota kořenů i nadzemní části klesá a hmota hlíz se zvětšuje (VOKÁL et al. 2000).

Podzemní hmota se vyvíjí dříve a rychle roste u ranných odrůd, a to jak stonky, tak hlízy. Ranné odrůdy vytvářejí rychle hlízy a jejich růst končí dříve, než růst středně ranných a středně pozdních odrůd. Maximum hmoty kořenů je v období kvetení (KOLBE, STEPHAN- BECKMANN 1997).

Jednotlivá stádia vývoje brambor jsou znázorněna na obrázku č. 2:

**Obrázek č. 2** - Vývojová stádia bramboru (HÄCK et al. 1993)



### **Tuberizace**

Tuberizace je sezónní vývojový jev regulovaný fotoperiodou a fytohormony (kyselina tuberonová, cytokininy, kyselina abscisová). Na indukci procesu se podílí i vnější podmínky - vlhké prostředí umožňuje metamorfózu stonku v hlízu (SLABÝ, KREJČÍ 2005).

Většina hlíz je založena již ve velmi krátké době - do 10. dne, zatímco maximální počet hlíz je dosažen až při odumírání nadzemní biomasy (KOLBE, STEPHAN-BECKMANN 1997).

Celý proces tuberizace probíhá ve třech etapách (PROCHÁZKA et al. 1998):

1. **stolonizace** - indukce a horizontální růst oddenků (je spojený s dlouhivým růstem bez větvení, a tudíž s uplatněním apikální dominance)
2. **inhibice růstu stolonů** - uplatňuje se krátký den a pokles obsahu GA
3. **indukce a iniciace růstu hlíz** - je spojena s aktivací apikálního meristému stonku a radiálním dělením jeho iniciál, zde se uplatňuje vliv cytokininů a ABA

### **2. 4. 2. Změny kvality hlíz v závislosti na vývoji**

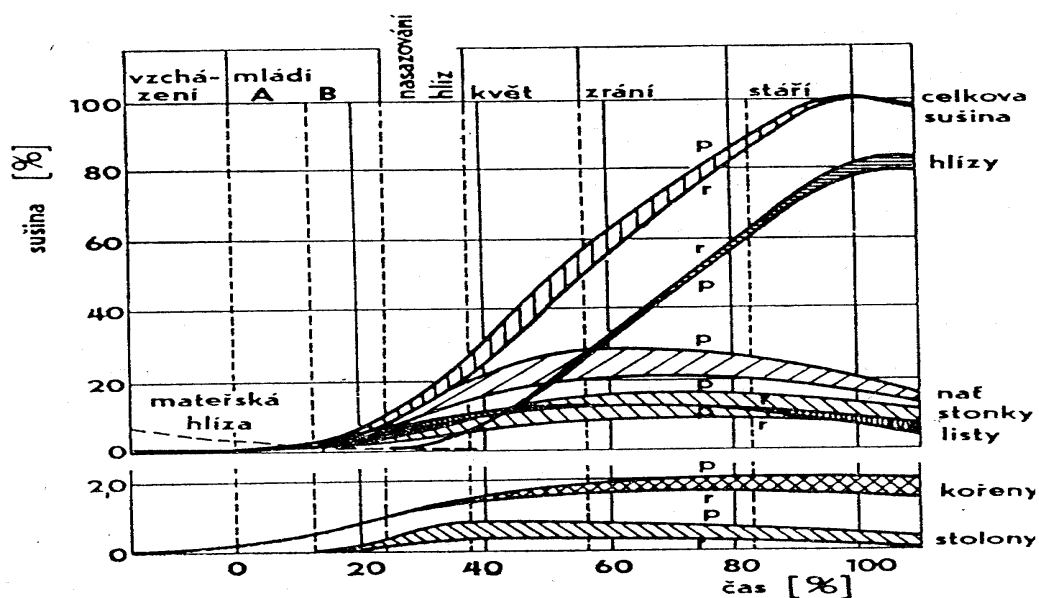
#### **Faktory ovlivňující obsah sušiny:**

Výše obsahu sušiny je ovlivněna odrůdou, a to z 81,58 %, prostředí působí z 10,85 % a interakce odrůda x prostředí ze 7,30 % (RYBÁČEK et al. 1988). Samotný obsah sušiny v hlízách brambor se může pohybovat v poměrně širokém rozpětí. ŠMÁLIK (1987) uvádí obsah sušiny hlíz v rozpětí 13,1 až 36,8 %. Obecně se předpokládá, že lepší podmínky pro vyšší obsah sušiny v hlízách jsou v nižších polohách (MÍČA, VOKÁL 1995) a také, že odrůdy rané mají nižší obsah sušiny než odrůdy pozdní.

Vedle toho kolísání obsahu sušiny u odrůd na různých lokalitách o 2 - 4,5 % spolu s vlivem výživy ukazují možnosti zvyšování obsahu sušiny také hnojením a agrotechnikou. Obecně je uváděno, že rostoucí dávka N snižuje obsah sušiny hlíz (RYBÁČEK et al. 1988) a je doporučena optimální dávka N hnojení 120 kg N.ha-1 (MÍČA et al. 1986).

Rovněž je uváděno, že obsah sušiny hlíz koreluje s délkou vegetační doby (DOBIÁŠ, MÍČA 1985; ZRŮST, HOLÁ 1994). Největší intenzita tvorby sušiny je v období mezi plným květem a odkvětem rostliny, kdežto v období mezi odkvětem rostliny a zráním je tato intenzita nižší (KOLBE, STEPHAN- BECKMANN 1997) (viz. obrázek č. 3).

**Obrázek č. 3** - Průběh přírůstku sušiny bramborů (RAEUBER a ENGEL 1966)



### Změny obsahu dusíkatých látek a proteinů v hlíze

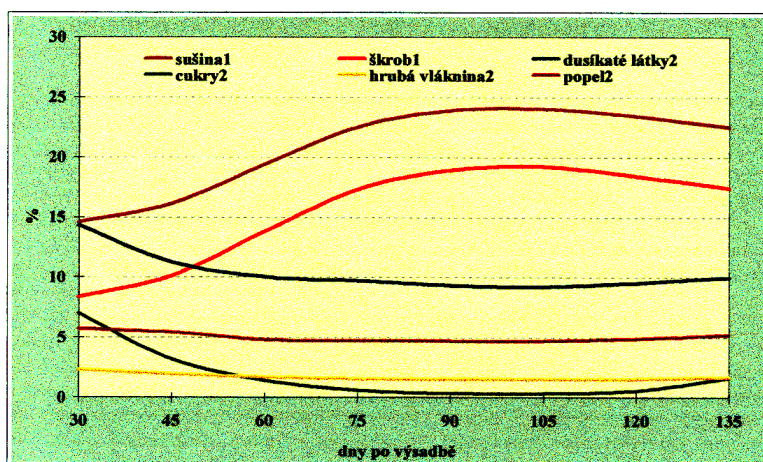
Obsahy NL a jejich jednotlivých složek se v hlízách mění v průběhu vegetace. Z tabulky č. 3 je patrné, že u všech dusíkatých složek dochází v průběhu vegetace ke snižování jejich obsahu v hlízách. Nejnižších obsahů dusíkatých složek je dosahováno kolem 90. dne po vzejití rostliny (období maximálního nárůstu hmoty hlíz). V období zralosti hlíz dochází k mírnému zvýšení obsahů jednotlivých složek oproti stavu z 90. dne po vzejití (viz obrázek č. 4). Z uvedeného vyplývá, že se změnou obsahu NL v průběhu vegetace souvisí velikost hlíz. Uvádí se, že hlízy menší velikosti obsahují větší množství NL (KOLBE, STEPHAN- BECKMANN 1997).

Podobně jako většina ostatních látek ani NL nejsou v hlíze rozmístěny zcela rovnoměrně (RYBÁČEK et al. 1988) (viz. obrázek č. 1).

**Tabulka č. 3** - Změny dusíkatých látek během růstu bramborové hlízy (KOLBE & STEPHAN-BECKMAN 1997)

Forma ros. N	Dny po vzejtí						
	30	45	60	75	90	105	120
<b>Celkový N</b>	2,290	1,800	1,600	1,550	1,490	1,470	1,520
<b>Bílkovinný N</b>	1,290	1,000	0,900	0,820	0,810	0,830	0,840
<b>Nebílkovinný N</b>	1,000	0,810	0,670	0,650	0,650	0,640	0,660
<b>Amidický N</b>	0,143	0,109	0,091	0,082	0,080	0,083	0,091

**Obrázek č. 4** - Změny v obsahu hlavních látek bramborové hlízy v průběhu vegetace (převzato BÁRTA 2002)



### **2. 4. 3. Význam a působení dusíkatého hnojení na vnější a vnitřní kvalitu hlíz**

Dusík rozhodujícím způsobem ovlivňuje výši výnosu brambor, podílí se na kvalitě hlíz - obsah škrobu, sušiny a bílkovin v hlízách, konzistence dužniny, velikost hlíz (VOKÁL et al. 2000).

Největší nároky jsou v období začátku tvorby pupat až květu. Výše výnosu je ovlivňována především zvýšením hmotnosti hlíz jednoho trsu, vliv na počet hlíz je poměrně malý. Při vyšších dávkách N lze předpokládat vyšší obsah dusíkatých látek v hlízách a zvýšení podílu větších hlíz. Opačně nižší obsah škrobu i sušiny a zejména při přehnojení N prodloužení vegetační doby. Optimalizace hnojení N vytváří příznivé podmínky pro vzcházení, rychlý počáteční růst porostu a nasazování hlíz (JŮZL et al. 2000).

## **2. 5. Vlastnosti proteinů a metody používané při jejich analýze**

### **2. 5. 1. Vlastnosti proteinů umožňující jejich analýzu**

Bílkoviny jsou sloučeniny schopné nést jak kladný tak i záporný náboj. Většina jejich náboje pochází z ionizace karboxylových a aminových skupin a je závislá na pH okolního média (pufro) a na počtu a typu aminokyselin nesoucích tyto skupiny. Pro každou bílkovinu existuje určitá hodnota pH zvaná isoelektrický bod neboli hodnota pI, kdy její molekula nemá žádný náboj a je elektricky neutrální. Tato hodnota pH je pro každou bílkovinu specifická (VODRÁŽKA 1987).

V případě vyššího pH pufru než pI konkrétní bílkoviny platí, že tato bílkovina má záporný náboj a v elektrickém poli migruje ke kladné elektrodě (anodě) a u pH nižšího než pI bílkovinné molekuly dochází k jevu přesně opačnému.

Při elektroforetické separaci bílkovin založené na jejich mobilitě je nutné udržovat konstantní pH roztoku a tím i jejich mobilitu. Jelikož se při elektrolýze vody generují  $H^+$  a  $OH^-$ , musí být roztok pufovan (GARFIN 2000).

### **2. 5. 2. Lyofilizace**

Lyofilizace probíhá za vysokého vakua a nízkých teplot, umožňujících rychlou sublimaci rozpouštědla (vody). Rychlé mrznutí je důležité pro udržení stability lyofilizovaných proteinů. Naproti tomu pomalé mrznutí způsobuje vznik koncentračního gradientu a posun pH, který často vede k denaturaci proteinu (POHL 1990).

U správně lyofilizovaných produktů nedochází k přesoušení (ponechávají si tedy svůj nezbytný obsah vody), jsou velmi kypřé (dobře se rozpouštějí) a nízká teplota zastavuje enzymatické pochody (nedochází k samovolnému rozkladu) (PROSSER et al. 1989).



### **2. 5. 3. Metody analýzy proteinů**

#### **Chromatografické metody**

V současné době se pro izolaci proteinů používají také chromatografické metody, které jsou selektivní, účinné a díky své šetrnosti umožňují získat čistou a nativní bílkovinu (PROSSER 1989).

Chromatografické metody jsou separační metody, které využívají k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěma fázemi – nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně – chemických interakcí mezi složkami a mobilní fází, složkami a stacionární fází a také mobilní a stacionární fází. Může jít o adsorpci, rozpouštění, chemisorpci, srážení, tvorbu komplexů, síťový efekt, přičemž výsledné interakce jsou často kombinací uvedených procesů (SOMMER 2000).

Pro přípravu peptidových vzorků jsou tradičně používány nízkotlaké chromatografické metody. Metody používané k izolaci potravinových peptidů jsou vylučovací chromatografie, iontově výměnná chromatografie (IEC) a afinitní chromatografie (AC) (SOMMER et al. 1998, GILAR et al. 2001, HERRAIZ 1997).

#### **Vylučovací chromatografie**

Vylučovací chromatografie (SEC) je tradiční metodou, dělí peptidy podle molekulové velikosti. Můžeme takto čistit vzorky odstraněním solí a rušících, velmi malých nebo velmi velkých molekulárních složek. SEC používá zesíťovaný dextran, jehož velikost pórů určuje rozmezí molekulových hmotností složek, které mohou být izolovány ze směsi. (SOMMER 2000, GILAR et al. 2001, HERRAIZ 1997).

#### **Iontově výměnná chromatografie**

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je alternativní chromatografickou metodou k SEC pro přípravu peptidických vzorků. Tato metoda je založena na vratné výměně iontů mezi mobilní a stacionární fází, přičemž k dělení složek dochází v důsledku rozdílné velikosti náboje. Mohou být použity oba druhy iontoměníčů – anexy se zásaditými funkčními skupinami, které slouží k dělení aniontů a katexy s kyselými funkčními skupinami určené k dělení kationtů (GILAR et al. 2001, HERRAIZ 1997).

### **Afinitní chromatografie**

Peptidy obsahující velmi specifické funkční nebo aktivní skupiny mohou být izolovány afinitní chromatografií (AC). AC využívá biospecifické interakce receptorů kovalentně vázaných na agarosové matrici. AC může být použita např. na izolaci glykopeptidů vazbou na imobilizované lektiny nebo izolaci peptidů reakcí antigen-protilátka (HERRAIZ 1997, KAJIWARA 1999).

### **Elektroforetické metody**

#### Princip metod

Elektromigrační separační metody jsou založeny na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato pohyblivost závisí na velikosti náboje, na velikosti a tvaru molekul, na podmínkách prostředí a na síle elektrického pole. Velikost náboje potom ovlivňuje stupeň ionizace, iontová síla a pH prostředí. Na separaci jednotlivých částic mají vliv fyzikálně-chemické vlastnosti samotných částic, vlastnosti prostředí, Jouleovo teplo, elektroosmotický tok, difúze a vlastnosti elektrického pole. Látky musí mít charakter iontů nebo amfolytů (CHURÁČEK 1993).

Elektroforéza slouží k dělení látek biologického původu – bílkovin, nukleových kyselin, polysacharidů, tkáňových extraktů i buněk (PROSSER et al. 1987).

#### **Elektroforéza**

Pro separaci bílkovin v bramborové hlíze se využívá metoda zónové vertikální elektroforézy na gelovém nosiči. Jedná se o chemicky inertní a mechanicky stabilní polyakrylamidový gel, který vzniká polymerací 40% roztoku monomerního akrylamidu a 2% roztoku bis-akrylamidu jako tzv. cross-linkeru. Jeho úloha je vytvářet 3D mřížkovou strukturu s určitou velikostí pórů. Velikost pórů je dána hmotnostními procenty monomeru a cross-linkeru v roztoku v g/100ml a poměrem hmotnosti cross-linkeru a sumy hmotností monomeru a cross-linkeru. Tato mřížková struktura gelu s definovanou velikostí pórů omezuje pohyb migrujících bílkovinných molekul a jejich schopnost projít těmito póry závisí na jejich velikosti a struktuře (WESTERMEIER 2001).

## **Elektrické veličiny**

Elektrické veličiny, které se uplatňují v elektroforéze, jsou elektrický proud  $I$  [A], napětí  $U$  [V], odpor  $R$  [ $\Omega$ ] a výkon  $P$  [W]. Jejich vzájemný vztah je dán dvěma základními rovnicemi:

$$U = I \times R \text{ (Ohmův zákon)}$$

a

$$P = I \times U \text{ neboli } I^2 \times R$$

Hlavní hnací silou elektroforézy je síla elektrického pole, které je ustanoveno po aplikaci napětí v systému, přičemž rychlost molekuly je přímo úměrná okolnímu napěťovému gradientu. Platí, že čím vyšší je napětí, tím větší je síla elektrického pole vyjádřeného ve V/cm a rychlejší průběh elektroforézy. Toho lze využít v aplikacích s intenzivním působením difúze. Nevýhodou je velká produkce elektrické energie, která se mění v teplo. Aby nedošlo k destrukci analyzovaných bílkovin, je proto doporučováno používat chlazení elektroforetické komory. Chlazení také redukuje tzv. smoking efekt (zakřivení, prohnutí okrajů pásů jednotlivých bílkovin na elektroforegramu), který vzniká v důsledku různé mobility v gelu zapříčiněné špatným odvodem tepla. Efektivita chlazení ovšem není nekonečná, a proto by měl být výkon pomocí napěťového zdroje limitován. Na napěťovém zdroji lze nastavovat limity pro napětí, proud nebo výkon. Během elektroforézy může být limitní a zároveň konstantní pouze jeden z těchto parametrů, který zároveň určuje hodnoty zbylých dvou parametrů. Vzájemné závislosti mezi těmito parametry jsou obsaženy ve výše uvedených dvou základních rovnicích. Výběr limitního parametru záleží na mnoha faktorech, hlavně ale na typu elektroforézy (kontinuální versus diskontinuální), na požadované době trvání běhu analýzy, na potřebě minimalizovat difúzi bílkovin atd. Pro dosažení co nejlepších výsledků s dobrou reprodukovatelností je výběr limitního parametru velmi důležitý (GARFIN 2000).

## **Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS**

Jednoduchá a široce užívaná metoda pro analýzu peptidů je zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) (TSUDA et al. 1993, MAYER 2001). Základem je elektroforéza komplexů denaturovaných peptidů s anionaktivním detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS), který se váže na peptidy a uděluje jim záporný náboj. Výsledné komplexy SDS-peptidy mají stejnou hustotu povrchového

náboje a relativní molekulová hmotnost peptidu odpovídá velikosti jeho komplexu s SDS (MAYER 2001).

Nábojové rozdíly mezi různými peptidy se navázáním SDS téměř úplně potlačí, tyto komplexy jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě. Jejich pohyblivost v gelu je dána velikostí molekuly. Srovnáním pohyblivosti separovaných látek se standardy o známých molekulových hmotnostech lze určovat molekulové hmotnosti peptidů (KRÁLOVÁ et al. 2001, BÍLKOVÁ et al. 1999, CHIOU 1999).

Takto separované peptidy jsou nejčastěji detekovány specifickým barvením (amidočern, methylenová modř, Coomassie modř apod.). Pro zvýšení účinnosti lze použít fluorescenční či radioaktivní značení (VAŇKOVÁ 1999).

Nejčastěji se používá barvení, kdy se gel po elektroforéze ponoří do barviva, které se naváže na povrch bílkoviny. Gel se poté odbarvuje ve zředěné kyselině octové. Pokud je barvivo vázáno na bílkoviny, tak k odbarvení nedojde a zóny bílkovin jsou barevné na odbarveném pozadí (KRÁLOVÁ et al. 2001, BÍLKOVÁ et al. 1999).

### **3. CÍL PRÁCE**

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo hodnocení orgánové a hlízové variability proteinů druhu *Solanum tuberosum L.* v závislosti na ontogenezi rostliny. Byly hodnoceny proteinové profily kořene, stolonu, stonku, listu a květu. U hlíz bylo provedeno detailnější hodnocení rozdílů v proteinovém spektru v závislosti na jednotlivých vrstvách pletiv (korová vrstva, oblast cévního svazku, dřeň, srdéčko). Změny byly sledovány modelově na dvou vybraných odrůdách s rozdílným stupněm ranosti – Adora (velmi raná) a Bionta (polopozdní).

Vzorky hodnocených materiálů byly odebírány v několikadenních intervalech. Byly sledovány následující parametry: průměrná hmotnost hlízy, obsah sušiny, obsah hrubých bílkovin a obsah čistých bílkovin. U odebraných vzorků rostlinných pletiv byly získány extrakty proteinů, které byly následně analyzovány pomocí elektroforetické techniky SDS-PAGE. Informace z elektrogramů byly transformovány do elektronické podoby a zpracovány pomocí speciálního softwaru BioProfil 1 D++.

U jednotlivých vzorků byla hodnocena kvalitativní variabilita a změny v relativním zastoupení hlavních proteinů v závislosti na ontogenetickém vývoji.

## **4. MATERIÁL A METODY**

### **4. 1. Materiál**

Napěstování rostlinného materiálu – bramborových trsů – bylo provedeno formou polního pěstování. Byly použity dvě odrůdy s rozdílnou raností Bionta a Adora.

Brambory byly vypěstovány v roce 2006 na školním pozemku Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích. Pozemek se nachází v nadmořské výšce 383 m. n. m. v oblasti bramborářského výrobního typu a průměrnou roční teplotou 7,8 °C a průměrným ročním úhrnem srážek 620 mm.

V tabulce č. 4 jsou uvedeny hodnoty půdního rozboru provedeného na pokusném pozemku. Rozbor ukazuje stav půdy, zásobení živinami a pH těsně před výsadbou pokusných odrůd.

**Tabulka č. 4 - AZP před výsadbou pokusu**

Označení	pH/ CaCl <sub>2</sub>	Obsah přijatelných živin				Cox	N total	N-NH <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>
		Ca	P	K	Mg				
		mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>				
CB1 ()	5,74	980	18	128	113	20,2	0,13	3,43	7,70

Na podzim předchozího roku byl pozemek organicky vyhnojen dávkou 35 t hnoje na ha. Před výsadbou byl pozemek vyhnojen N v dávce 100 kg.ha<sup>-1</sup> (síran amonný), fosforem 35 kg.ha<sup>-1</sup> a draslíkem 60 kg.ha<sup>-1</sup> (60 % draselná sůl). V průběhu vegetace byl porost mechanicky ošetřen proti plevelům (3x proorávka). Chemicky ošetřen proti plísni bramborové a mandelince bramborové.

Charakteristika polního pěstování s datumy odběrů vzorků je uvedena v tabulce č. 5.

#### **Adora**

Odrůda pro letní konzum. Hlízy jsou velké, oválné, se středně hlubokými očky, s krémovou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz rychlý. Počet hlíz pod trsem nízký, škrobnatost hlíz 13,8 %. K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 středně náchylná, proti napadení háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní (ČERMÁK 2006).

## **Bionta**

Pozdní konzumní odrůda. Hlízy jsou středně velké, krátce oválné, se středně hlubokými očky, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě středně rychlý, nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký, škrobnatost hlíz 17,0 %.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 silně náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní (ČERMÁK 2006).

## **4. 2. Metody**

### **4. 2. 1. Polní pokus**

Pokus byl původně založen jako nádobový pokus již v roce 2005. Pěstování rostlinného materiálu v nádobách se však ukázalo jako nepřiliš vhodné, protože rostliny nebyly pěstovány v přirozených podmínkách, a to by se negativně ovlivnilo výsledky pokusu.

V roce 2006 byl založen nový pokus v polních podmínkách:

Založení pokusu: 16. 5. 2006

Výběr odrůd:

- Podle vegetační doby byla zvolena velmi raná odrůda Adora a polopozdní odrůda Bionta. Od obou genotypů bylo napěstováno 50 trsů.

Spon výsadby: 750 x 500 mm

Organizace pokusu:

- Obě odrůdy byly pěstovány ve dvou sousedících řádcích. Od okolního porostu byly pokusné odrůdy odděleny řádky netestované odrůdy brambor.
- Každý řádek pokusné odrůdy byl rozdělen na čtyři sekce.
- Vzorky byly odebírány od začátku každé sekce, vždy po jedné rostlině od každé odrůdy tzn. ve čtyřech opakováních.
- Vykopané hlízy byly spočítány, omyty ve vodě a označeny.
- Vzorky byly odebírány v jednotlivých růstových fázích rostlin (tabulka č. 5)
- V růstové fázi 4 a 5 u odrůdy Adora, 3 a 5 u odrůdy Bionta byla od každé odrůdy odebrána jedna celá rostlina, ze které byly odebrány dílčí vzorky: listů, natě, květů, stonků, kořenů a stolonů.
- Vzorky pro zjištění obsahu proteinů v jednotlivých vrstvách hlízy byly odebrány z vyzrálých hlíz.

**Tabulka č. 5** - Charakter průběhu polního pokusu (dle Raeuber et Engel), pozemek ZF JČU České Budějovice

Růstové fáze	Adora		Bionta	
	Datum odběru hlíz	Dny Po vzejití	Datum odběru hlíz	Dny po vzejití
<b>0</b> – objevení se prvních listů nad zemí	27. 5. 2006	0	5. 6. 2006	0
<b>1A</b> – růst listů, lodyh, kořenů (založení stolonů)	-	-	22. 6. 2006	18
<b>1B</b> – růst všech orgánů a nasazení hlíz (zák. květních poupat)	22. 6. 2006	28	28. 6. 2006	24
<b>2</b> – intenzivní růst orgánů natě, kořenů a hlíz (počátek květu)	28. 6. 2006	34	12. 7. 2006	38
<b>3</b> – intenzivní růst hlíz	12. 7. 2006	48	21. 7. 2006*	47
<b>4</b> – pokles hmoty nadzemní části, kořenů, zvětšování biomasy hlíz	21. 7. 2006*	57	31. 7. 2006	57
<b>5</b> – zasychání nadzemní biomasy	31. 7. 2006	67	21. 8. 2006*	78
<b>5</b> – zasychání nadzemní biomasy	21. 8. 2006*	88	4. 9. 2006	92
<b>5</b> – zasychání nadzemní biomasy	4. 9. 2006	102	-	-

Pokus byl založen: 16. 5. 2006

\*Datumy odběru vzorků ostatních orgánů rostlin: listů, natě, květů, stonků, kořenů a stolonů.

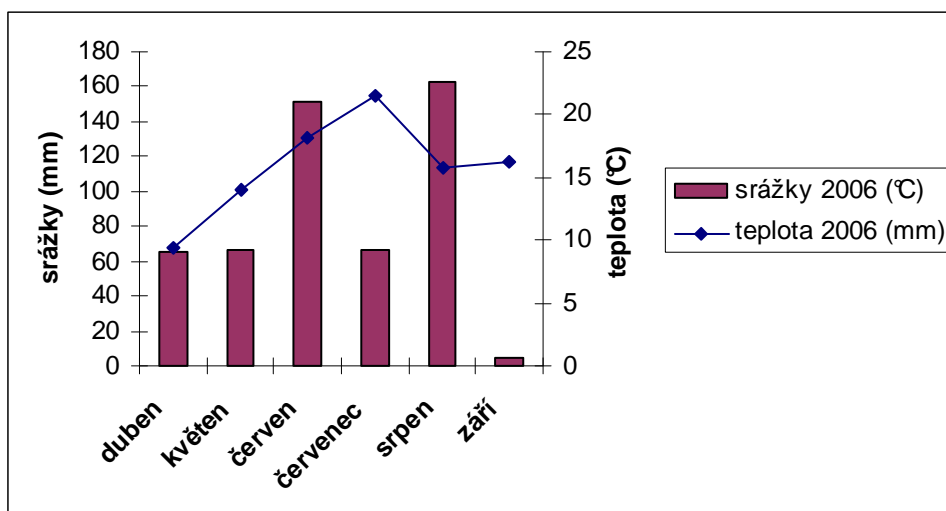
Pomlčkou jsou označeny růstové fáze, ve kterých nebyl u dané odrůdy proveden odběr vzorků.



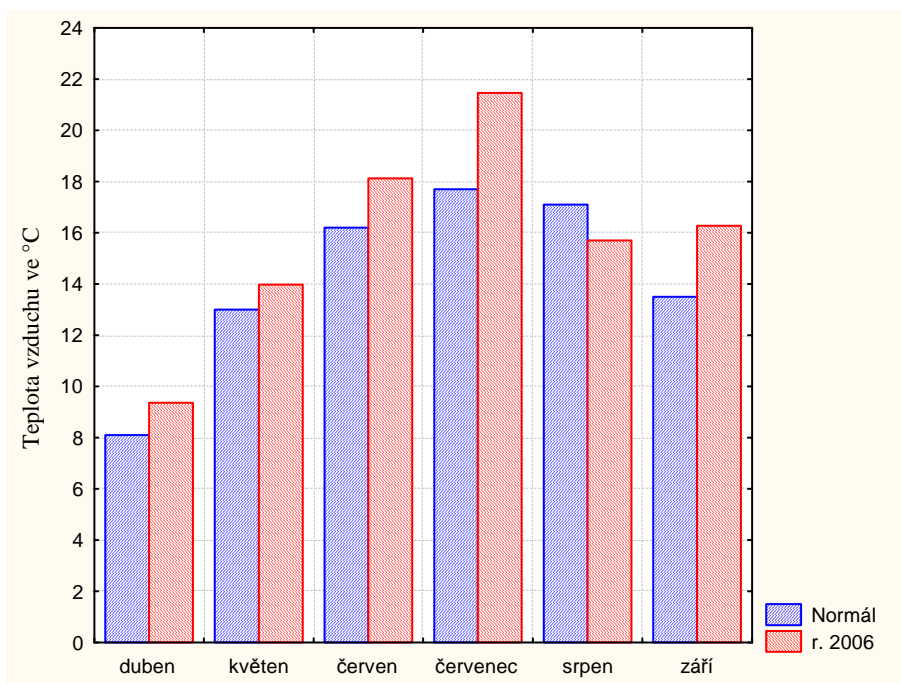
Meteorologická data:

- Průběh srážek a teplot během vegetační doby je znázorněn na obrázku č. 5
- Srovnání průměrných měsíčních teplot vzduchu s normálem (1961-1990) je znázorněn na obrázku č. 6
- Srovnání průměrných měsíčních úhrnů srážek v roce 2006 s normálem (1961-1990) je znázorněn na obrázku č. 7

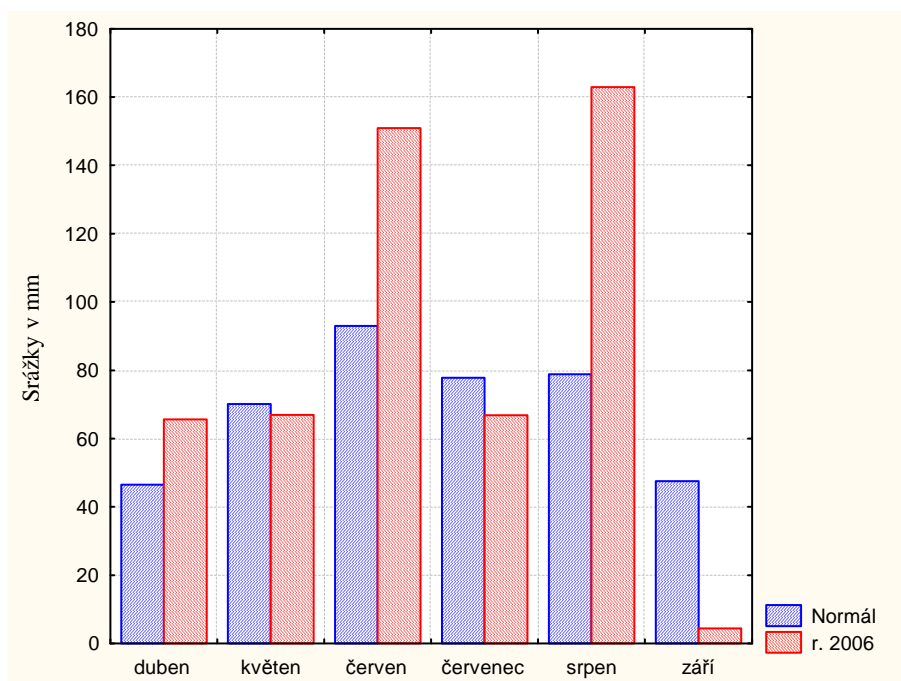
Obrázek č. 5 - Průměrné srážky a teploty za r. 2006



**Obrázek č. 6** - Průměrné měsíční teploty vzduchu ve °C za rok 2006 v porovnání s normálem (1961-1990)



**Obrázek č. 7** - Srovnání průměrných měsíčních úhrnů srážek v mm za rok 2006 s normálem (1961-1990)

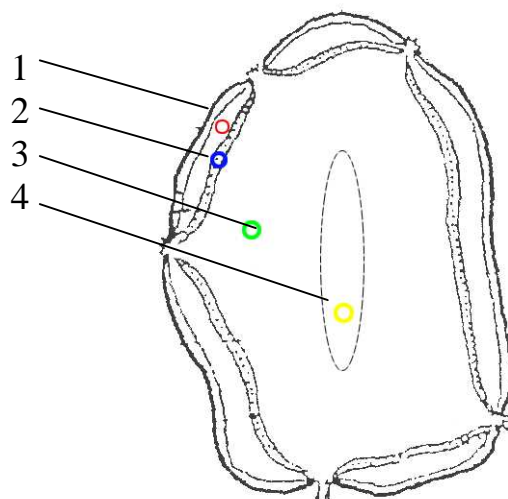


#### **4. 2. 2. Odběr vzorků z jednotlivých vrstev hlízy**

K odebrání vzorků byly použity vyzrálé hlízy, větší velikosti. Hlízy byly podélně rozříznuty od vrcholové části směrem k pupkové části hlízy.

Vzorky byly odebírány z jednotlivých vrstev hlízy pomocí korkovrtu s průměrem 5 mm, na čtyřech různých místech téže vrstvy (směsný vzorek). Vzorky byly odebírány z oblasti korové vrstvy, oblasti kruhu cévních svazků, dřene a srdéčka (viz. obrázek č. 8). Vzorky byly následně vysušeny (lyofilizace) a připraveny k vyhodnocení pomocí SDS-PAGE.

**Obrázek č. 8** - Nákres odběru vzorků z hlízy



1= korová vrstva, 2= oblast cévních svazků, 3= dřeň, 4=srdéčko

#### **4. 2. 3. Odběr vzorků rostlin**

Během vegetace byly provedeny odběry celých rostlin, ze kterých byly následně odebrány dílčí vzorky: listů, natě, květů, stonků, kořenů a stolonů. Odběry byly provedeny ve dvou růstových fázích (ve fázi 4 a 5 u odrůdy Adora, 3 a 5 u odrůdy Bionta), vždy v jednom opakování.

Rostliny byly ručně vytrženy a po vymytí zeminy z kořenů a osušení rostlin, byly nůžkami odebrány dílčí vzorky všech jmenovaných orgánů.

#### **4. 2. 4. Charakterizace hlízových proteinů pomocí elektroforézy SDS-PAGE**

##### **Extrakce celkového proteinu hlíz**

K 200 mg homogenizované bramborové mouky, bylo přidáno 2 ml extrakčního pufru (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% 2-merkптоethanol, 2% SDS). Extrakce probíhala po dobu 4 hodin při teplotě 4°C. Po centrifugaci (10 min, 9000g, 4°C), byl čistý supernatant přenesen do nové mikrocentrifugační zkumavky s příslušným množstvím (4:1) nanášecího pufru (5 x NP: 5 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.3 g SDS, 10 ml glycerol, 5 mg Bromphenol Blue; k 1 ml se těsně před použitím přidá 340 µl 2-merkптоethanolu). Před nanášením na gel v množství 15 µl byl vzorek vařen ve vodní lázni.

##### **SDS-PAGE**

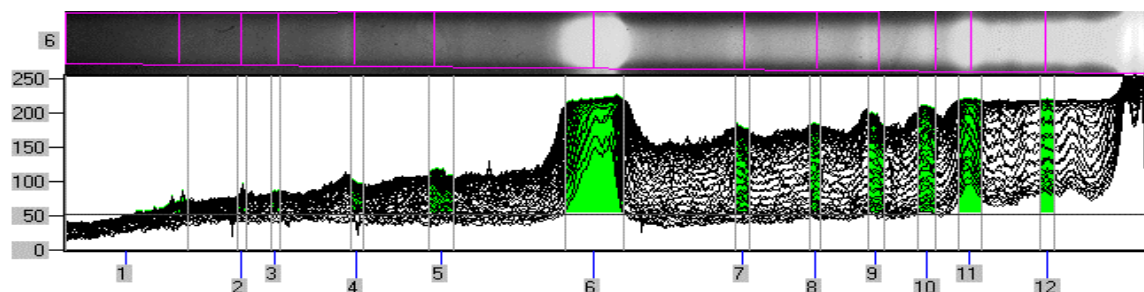
Použita byla diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamydovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) – 4% zaostřovací gel (0,125 M Tris-HCl, pH 6.8 + SDS) a 10% separační gel (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 + SDS) – v prostředí systému 0,025 M Tris + 0,192 M glycine (pH 8.3) + SDS. Podrobné složení gelových systému a elektrodového pufru je uvedeno v tabulce č. 6. Separace probíhala při proudu 40mA na gel, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4 hod.

##### **Detekce SDS-bílkovin na gelu a stanovení podílu bílkovin patatinového komplexu**

Detekce bílkovin byla provedena barvením roztokem Coomasie Brilliant Blue přes noc (barvicí směs – methanol, ledová kys. octová, voda v poměru 5:1:4 + 0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Po detekci bylo odbarveno nespecifické pozadí (použita směs etanol: kyselina octová: voda v poměru 2.5:1:6.5 s výměnou během odbarvení 2 – 3x) a provedena fixace a dehydratace ve směsi 45% etanolu + 3% glycerolu. Následně byly gely sušeny v celofánu na skle při laboratorní teplotě na vzduchu po 2 – 3 dny (ČURN et al. 1995). Před vlastním softwarovým stanovením procentického zastoupení patatinových bílkovin byly gely digitalizovány prostřednictvím scanneru do podoby TIFF formátu. Kvantifikace bílkovin patatinového komplexu bylo provedeno pomocí softwaru BioProfil. Záznam stopy bílkovinného spektra vzorku separovaného technikou SDS-PAGE byl upraven (invertován) do podoby zpracovatelné softwarem BioProfil. Každý vrchol (zeleně) znázorňuje zónu separované bílkovinné frakce. Na základě plochy

vrcholu je stanoven procentický podíl bílkovinné frakce. Vrchol 6 lokalizuje bílkoviny patatinového komplexu viz. obrázek č. 9.

**Obrázek č. 9** - Kvantifikace bílkovin patatinového komplexu pomocí softwaru BioProfil



**Tabulka č. 6** - Složení roztoků pro SDS – PAGE (denaturační systém)

Komponenta	Jednotka	Separáční gel	Zaostřovací gel 3,75 %
Dedestilovaná voda	ml	42	12,15
AC / BIS	ml	26,6	2,5
Pufr A	ml	10	-
Pufr B	ml	-	5
SDS	�l	800	200
Siřičitan sodn�	�l	60	20
Persíran amonn�	�l	400	150
TEMED	�l	40	20

Poznámky:

AC/BIS: 30 g akrylamid + 0,8 g BIS/100ml

Pufr A: 36,3 g Tris, 48 ml 1M HCl, pH 8,8/100ml

Pufr B: 6g Tris, 48 ml 1M HCl, pH 6,8/100 ml

Siřičitan sodn : nasycen  vodn  roztok

Persíran amonn : 15% roztok

SDS: 10 % roztok

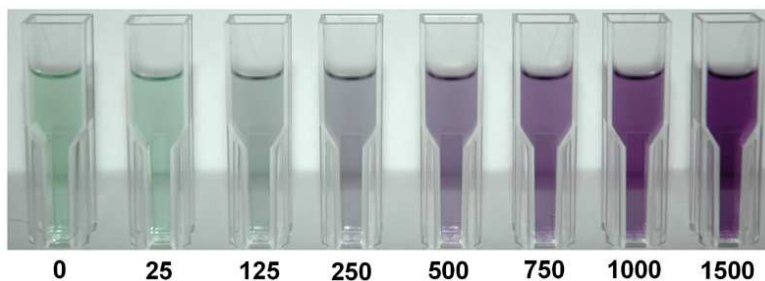
Elektrodov  pufr 1: 14,4 g glycinu, 3 g Tris, pH 8,3/100ml

Elektrodov  pufr 2: 144g glycin, 3 g Tris, 10 g SDS, pH 8,3/100ml

#### **4. 2. 5. Stanovení obsahu bílkovin v hlízách (čistých bílkovin)**

Celkový čistý protein byl extrahován z lyofilizované bramborové mouky pomocí SDS extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS) bez přítomnosti redukujícího 2-merkptoethanolu. K 200 mg lyofilizované bramborové mouky, bylo přidáno 2 ml výše uvedeného SDS extrakčního pufru. Extrakce probíhala 4 hodiny při teplotě 4°C. Po centrifugaci (9000 g; 10 minut; 4°C) bylo odebráno 500 µl supernatantu. Vzhledem k tomu, že extrakční pufr nemohl obsahovat inkompatibilní 2-merkptoethanol nebyla zcela zastavena enzymatická aktivita. Z tohoto důvodu byly vzorky uvařeny (2 min., 100°C). Vlastní analýza čistého proteinu byla provedena prostřednictvím BCA Protein Assay (analytický kit firmy Pierce, USA) podle pokynů přiloženého protokolu. Na obrázku č. 10 je ukázka zbarvení kalibračních standardů o různé koncentraci hovězího sérového albuminu (BSA µg.ml<sup>-1</sup>).

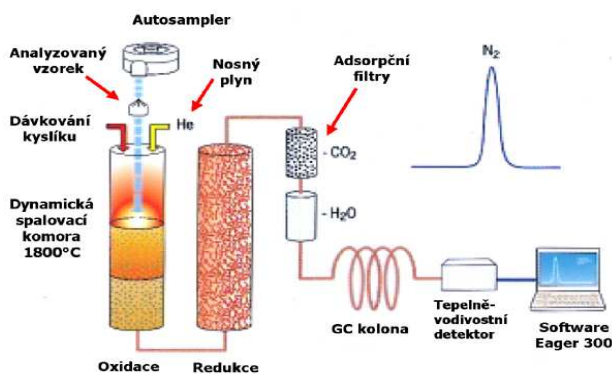
**Obrázek č. 10** - Ukázka zbarvení kalibračních standardů o různé koncentraci hovězího sérového albuminu (BSA µg.ml<sup>-1</sup>)



#### **4. 2. 6. Stanovení obsahu celkového dusíku v hlízách (hrubých bílkovin)**

Obsah dusíku v sušině hlíz byl stanoven modifikovanou Dumasovou metodou (Dynamic Flash Combustion technique) prostřednictvím přístroje Flash EA 1112 (obrázek č. 11). Pro stanovení byl použit lyofilizovaný hlízový materiál získaný při stanovování sušiny hlíz a upravený homogenizací v laboratorním šrotovníku. Provedena byla dvě opakování s navážkou vzorku 100 mg.

**Obrázek č. 11** - Proces stanovení obsahu dusíku na přístroji Flash EA 1112 (ThermoQuest, 1999)



#### **4. 2. 7. Průměrná hmotnost hlíz**

Z celkové hmotnosti všech hlíz v trsu, byla vypočítána průměrná hmotnost jedné hlízy.

#### **4. 2. 8. Obsah sušiny**

Z hlízy byl odříznut tenký plátek z celého profilu hlízy. Vzorek v čerstvém stavu byl zvážen na analytických vahách a vysušen, při teplotě – 50 °C a tlaku 40 mBar po dobu 48 hod. Po vysušení byl vzorek opět zvážen. Z rozdílu hmotnosti byla vypočítána sušina vzorku.

#### **4. 2. 9. Statistické zpracování dat**

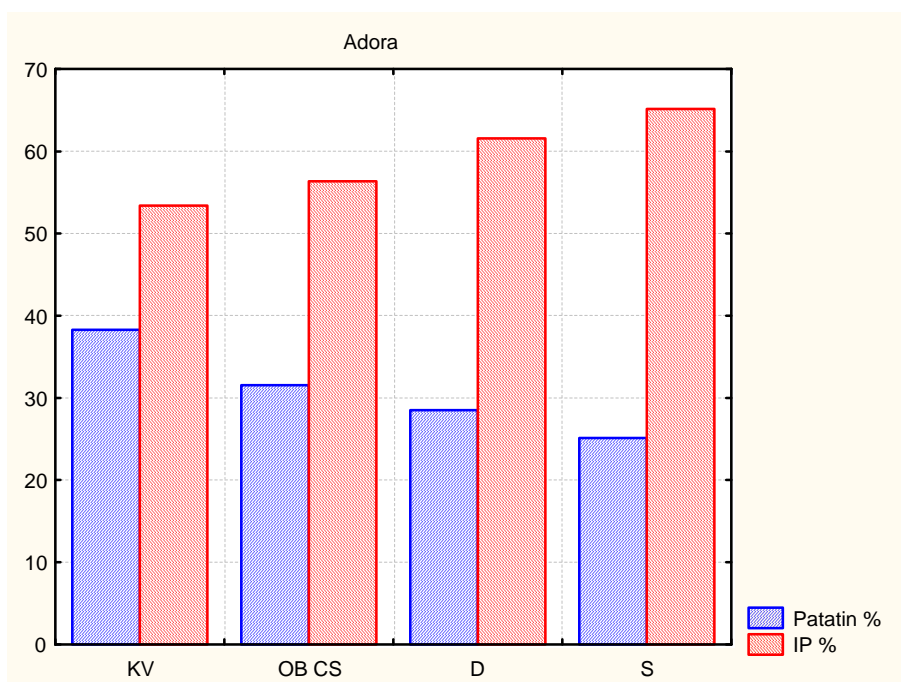
Statistické vyhodnocení dat jednotlivých parametrů bylo provedeno pomocí software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., 2001). Základem pro vyhodnocení byla korelační matice (hodnocení vzájemných vztahů mezi sledovanými vlastnostmi) a jednocestná analýza rozptylu (ANOVA).

## 5. VÝSLEDKY

### 5. 1. Proteinové profily jednotlivých vrstev hlízy - vyhodnocení elektroforeogramů

Z výsledků je patrné, že rozložení proteinů v hlíze se v jednotlivých vrstvách liší. Směrem do středu hlízy dochází ke snižování obsahu proteinů. Největší obsah byl zjištěn v korové vrstvě: Adora v průměru 42 % patatinu a 45 % inhibitorů proteáz, Bionta v průměru 33% patatinu a 41 % inhibitorů proteáz. Změny v obsahu proteinů u obou odrůd ukazuje obrázek č. 12, 13. Na obrázku č. 14. jsou fotografie elektroforeogramů, znázorňující proteinové spektrum v jednotlivých vrstvách hlízy.

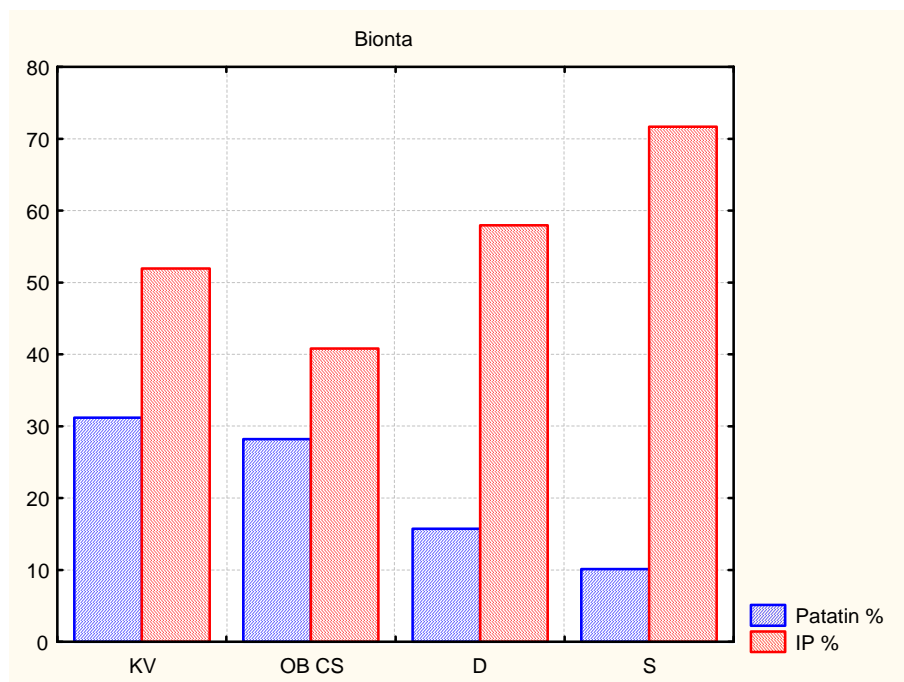
**Obrázek č. 12** - Změny obsahu proteinů v jednotlivých vrstvách hlízy bramboru u odrůdy Adora v %



KV=korová vrstva, OB CS=oblast cévních svazků, D= dřev, S=srdéčko, IP=inhibitory proteáz



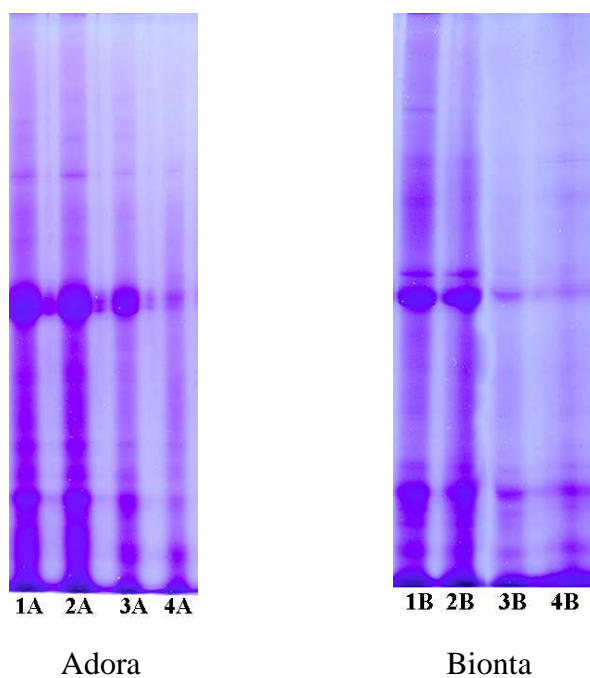
**Obrázek č. 13** - Změny obsahu proteinů v jednotlivých vrstvách hlízy bramboru u odrůdy Bionta v %



KV=korová vrstva, OB CS=oblast cévních svazků, D= dřeň, S=srdéčko, IP=inhibitory proteáz

### Elektroforeogram – proteinové spektrum jednotlivých vrstev hlízy

**Obrázek č. 14** - Proteinová spektra jednotlivých vrstev hlíz

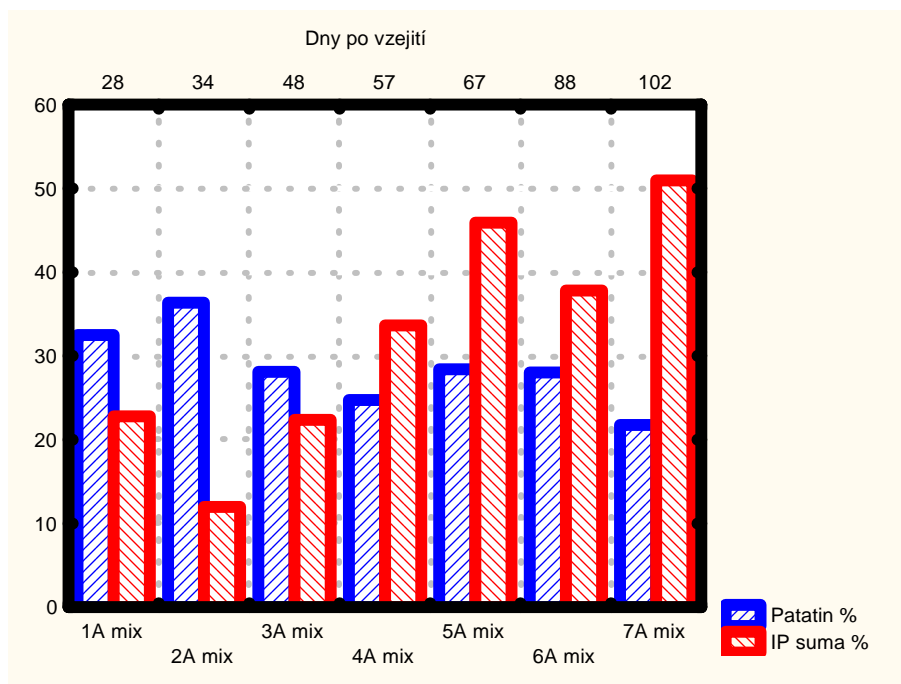


1A, 1B = korová vrstva; 2A, 2B = oblast cévních svazků; 3A, 3B = dřeň, 4A; 4B = srdéčko

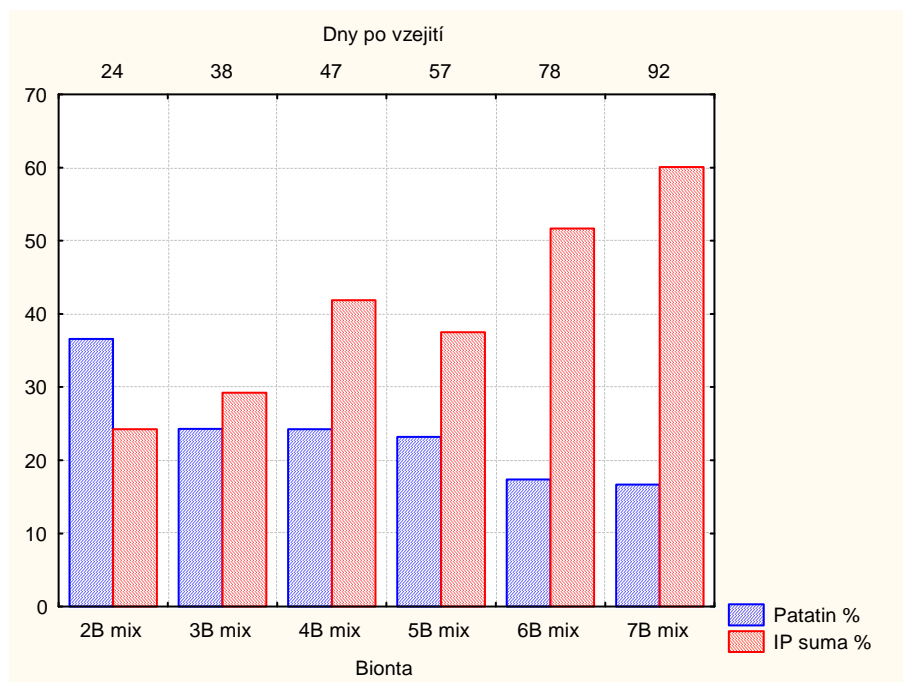
## 5. 2. Proteinové profily hlíz v průběhu vegetace - vyhodnocení elektroforeogramů

Na počátku vegetace, při prvním odběru obsahovaly hlízy odrůdy Adora v průměru 33 % patatinu a 25 % inhibitorů proteáz, odrůda Bionta 32% patatinu a 22% inhibitorů proteáz. Během vegetace dochází u obou odrůd k poklesu obsahu patatinu a nárůstu obsahu inhibitorů proteáz. Při posledním odběru obsahují hlízy odrůdy Adora v průměru 21 % patatinu a 51 % inhibitorů proteáz, odrůda Bionta 16 % patatinu a 64 % inhibitorů proteáz. Celý průběh změn v proteinového spektru hlíz bramboru ukazuje obrázek č. 15, 16.

**Obrázek č. 15** - Změna proteinové spektra hlízy bramboru u odrůdy Adora v průběhu vegetace



**Obrázek č. 16** - Změna proteinové spektra hlízy bramboru u odrůdy Bionta v průběhu vegetace



### **5. 3. Stanovení obsahu proteinů v ostatních orgánech rostliny brambor**

Obsah čistého proteinu byl stanoven v těchto orgánech: list, nať, květ, stonek, kořen a stolon. Vzorky byly u Adory odebrány v růstové fázi: **4** (pokles hmoty nadzemní části, kořenů, zvětšování biomasy hlíz) a **5** (zasychání nadzemní biomasy), u Bionty v růstové fázi **3** (intenzivní růst hlíz) a **5** (zasychání nadzemní biomasy).

Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulka č. 7, 8.

**Tabulka č. 7** - Množství čistého proteinu jednotlivých orgánů rostliny bramboru v %, zjištěných při 4. odběru 21. 7. 2006

<b>4. odběr 21. 7. 2006</b>	<b>Adora</b>	<b>Bionta</b>
<b>Květ</b>	-	17,207
<b>List</b>	12,049	14,956
<b>Stonek</b>	0,674	0,816
<b>Stolon</b>	0,661	9,280

**Tabulka č. 8** - Množství čistého proteinu jednotlivých orgánů rostliny bramboru v %, zjištěných při 6. odběru 21. 8. 2006

<b>6. odběr 21. 8. 2006</b>	<b>Adora</b>	<b>Bionta</b>
<b>List</b>	11,744	12,136
<b>Stonek</b>	0,961	0,772
<b>Stolon</b>	0,523	0,500
<b>Kořen</b>	0,835	0,891

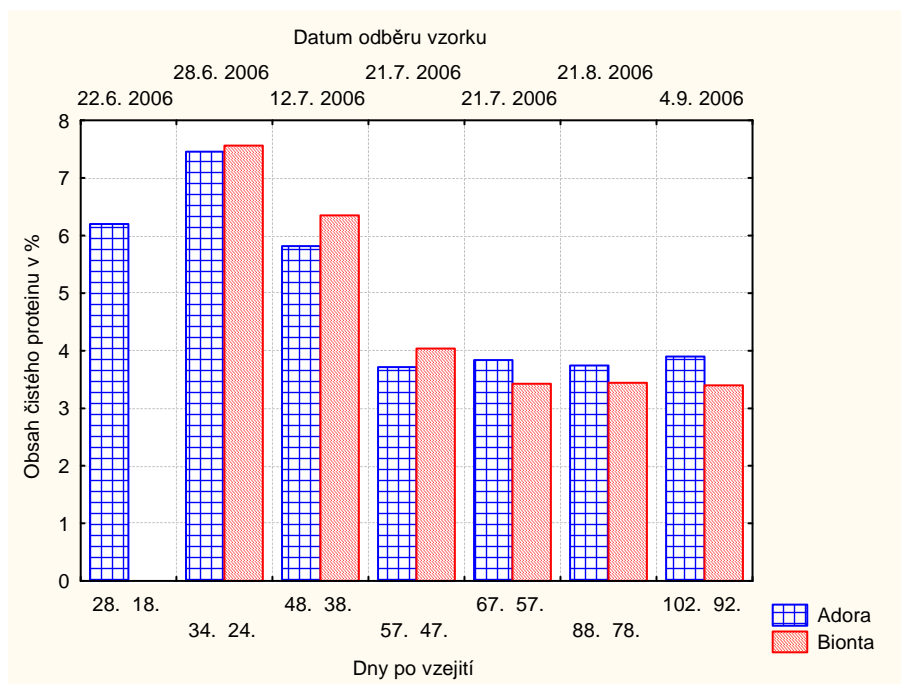
#### **5. 4. Stanovení obsahu proteinů v hlízách (obsah čistých proteinů)**

U odrůdy Adora dochází na počátku vegetace k mírnému nárůstu čistého proteinu, při prvním odběru 22. 6. 2006 (fáze růstu: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) byl obsah čistého proteinu 6,2 %, při druhém odběru 28. 6. 2006 (2 - intenzivní růst orgánů natě, kořenů a hlíz, počátek květu) byl obsah čistého proteinu 7,46 %. V dalších fázích růstu dochází k poklesu obsahu čistého na 3,71 %. Při posledním odběru 4. 9. 2006 (fáze růstu 5: zasychání nadzemní biomasy) se obsah čistého proteinu jen nepatrně zvyšuje na 3,90 %.

Odrůda Bionta má na začátku vegetace, při druhém odběru 28. 6. 2006 (fáze růstu: 1B - růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) 7,57 % čistého proteinu. Během dalšího růstu dochází již pouze k poklesu obsahu čistého proteinu až na 3,40 % při posledním odběru 4. 9. 2006 (fáze růstu: zasychání nadzemní biomasy).

Průběh změny obsahu čistého proteinu hlíz během vegetace u obou odrůd znázorňuje obrázek č. 17.

**Obrázek č. 17 - Změna obsahu čistého proteinu v průběhu vegetace**



### **5. 5. Stanovení obsahu celkového dusíku v hlízách (N-látky)**

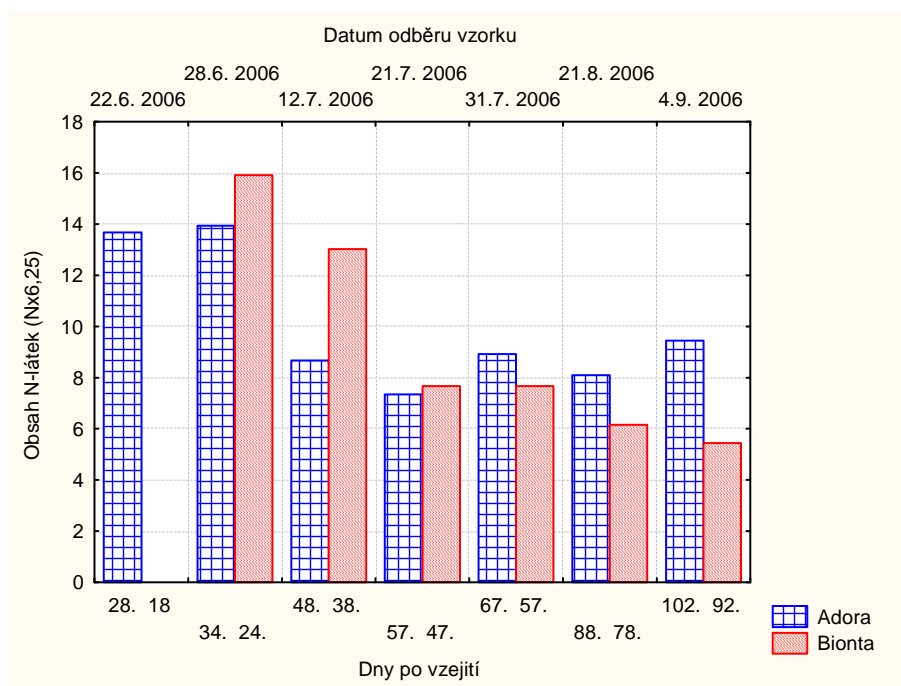
Adora: Na začátku vegetace, při prvních dvou odběrech se obsah N-látek v hlíze u odrůdy Adora téměř neliší. Při prvním odběru 22. 6. 2006 (fáze růstu: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) byl obsah N-látek 13,68 %, při druhém odběru 28. 6. 2006 (2 – intenzivní růst orgánů natě, kořenů a hlíz, počátek květu) byl obsah N-látek 13,94 %.

V dalších odběrech vykazuje odrůda Adora obsah N-látek kolem 8 % tzn., že v dalších růstových fázích dochází k poklesu obsahu N-látek. Při posledním odběru 4. 9. 2006 (fáze růstu 5: zasychání nadzemní biomasy) se obsah N-látek opět mírně zvýšil na 9,4 %.

Bionta: Ve srovnání s odrůdou Adora vykazuje odrůda Bionta na počátku vegetace vyšší obsah N-látek v hlíze. Při druhém odběru 28. 6. 2006 (fáze růstu: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) byl obsah N-látek 15,91 %. V dalších růstových fázích dochází k poklesu obsahu N-látek až na 5,44 % při posledním odběru 4. 9. 2006 (fáze růstu 5: zasychání nadzemní biomasy)

Průběh změny obsahu N-látek v sušině hlíz během vegetace u obou odrůd znázorňuje obrázek č. 18.

**Obrázek č. 18** - Změna obsahu N-látek (N x 2,6) v průběhu vegetace



## **5. 6. Obsah sušiny hlíz**

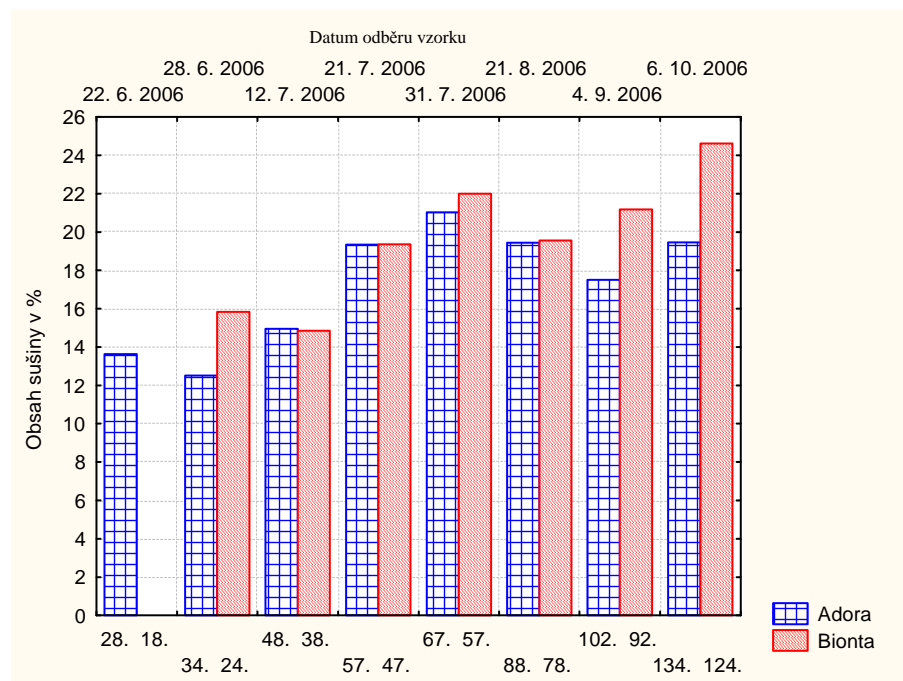
Adora: Při prvním odběru 22. 6. 2006 (růstová fáze: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) byl obsah sušiny v hlíze 13,63 %. Až do růstové fáze 5 (zasychání nadzemní biomasy), odběr 31. 7. 2006 dochází k nárůstu obsahu sušiny. Obsah sušiny v této růstové fázi byl 21,02 %. Další odběry ukazují na mírný pokles obsahu sušiny až na 17,51 %, odběr 4. 9. 2006. Při posledním, dodatečném odběru hlíz při sklizni došlo k opětovnému nárůstu obsahu sušiny hlízy na 19,46 %.

Bionta: Poloraná odrůda Bionta vykazuje od počátku vegetace nárůst obsahu sušiny v hlíze, při druhém odběru 28. 6. 2006 (fáze růstu: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat) byl obsah sušiny v hlíze 15,84 %. V porovnání s odrůdou Adora má odrůda Bionta během celé vegetace vyšší obsah sušiny.

K nárůstu sušiny v hlíze dochází až do růstové fáze 5 (zasychání nadzemní biomasy), odběr 31. 7. 2006. Obsah sušiny v této růstové fázi byl 21,99 %. Následující odběr ukazuje mírný pokles obsahu sušiny na 19,56 %, odběr 21. 8. 2006. Při posledním, dodatečném odběru hlíz při sklizni došlo k opětovnému nárůstu obsahu sušiny hlízy na 24,62 %.

Průběh změny obsahu sušiny hlíz během vegetace u obou odrůd znázorňuje obrázek č. 19.

**Obrázek č. 19** - Změna obsahu sušiny v průběhu vegetace



### **5. 7. Průměrná hmotnost hlíz**

Průměrná hmotnost hlíz a její změna v průběhu vegetace odpovídala fyziologické charakteristice odrůd.

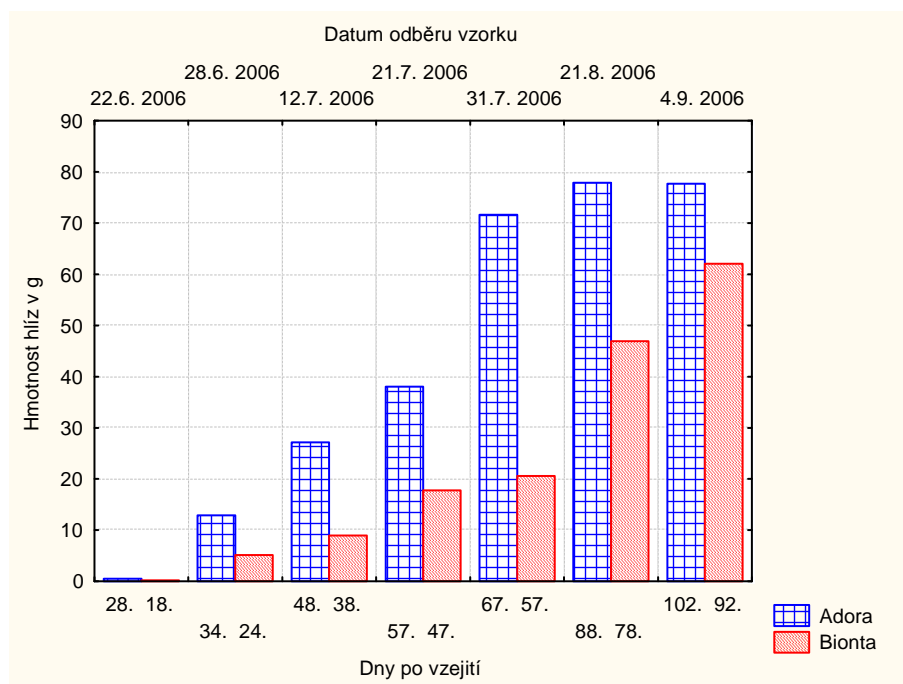
Při prvním odběru 22. 6. 2006 (růstová fáze: 1B – růst všech orgánů a nasazení hlíz, základ květních pupat), již raná odrůda Adora tvořila malé hlízy. Poloraná odrůda Bionta se v době prvního odběru nacházela ve fázi růstu 1A – růst listů, lodyh, kořenů, zakládání stolonů.

Po celou dobu sledování vykazovala odrůda Adora větší průměrnou hmotnost hlíz než odrůda Bionta. Ke konci vegetace dochází u odrůdy Adora k mírnému poklesu průměrné hmotnosti hlíz, průměrná hmotnost hlízy u odrůdy Bionta se stále zvětšovala.

Při předposledním odběru 21. 8. 2006 (fáze růstu: 5 – zasychání nadzemní biomasy) a posledním odběru 4. 9. 2006 (fáze růstu: 5 – zasychání nadzemní biomasy) dosahoval průměrná hmotnost hlízy u odrůdy Adora 77,89 g (předposlední odběr) a 77, 71g (poslední odběr) u odrůdy Bionta 46, 94 g (předposlední odběr) a 62, 10 g (poslední odběr).

Průběh změny průměrné hmotnosti hlíz během vegetace znázorňuje obrázek č. 20.

**Obrázek č. 20** - Změna hmotnosti hlíz v průběhu vegetace



### **5. 8. Vztahy mezi jednotlivými parametry hlíz**

**Adora:** U odrůdy Adora byly prokázány pozitivní korelační vztahy mezi průměrnou hmotností hlíz a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = +0,97$ ;  $p < 0,05$ , mezi obsahem N-látek a obsahem proteinů ( $r = +0,85$ ;  $p < 0,05$ ) a také mezi dobou odběru vzorku a sušinou ( $r = +0,75$ ;  $p < 0,05$ ).

Negativní korelační vťah byl prokázán u obsahu proteinů a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = -0,83$ , obsahu proteinů a průměrnou hmotností hlíz ( $r = -0,84$ ;  $p < 0,05$ ), obsahu proteinů a sušinou ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,05$ ).

**Bionta:** U odrůdy Bionta byly prokázány pozitivní korelační vztahy mezi průměrnou hmotností hlíz a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = +0,94$ ;  $p < 0,05$ , mezi obsahem N-látek



a obsahem proteinů ( $r = +0,99$ ) a také mezi růstovou fází (dny po vzejití) a sušinou ( $r = +0,81$ ;  $p < 0,05$ ).

Negativní korelační vztah byl prokázán u obsahu proteinů a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = -0,89$ , obsahu proteinů a sušinou ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ) a obsahu N-látek a sušiny ( $r = -0,87$ ;  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 9 ukazuje výsledky analýzy rozptylu obsahu dusíku, tabulka č. 10 popisuje korelační vztahy mezi jednotlivými parametry u testovaných odrůd, tabulka č. 11 popisuje korelační vztahy mezi proteiny hlízy a růstovou fází (dny po vzejití).

**Tabulka č. 9** - Analýza rozptylu – hlavních efektů obsahu dusíku u ověřovaných odrůd brambor v různých fázích vývinu a zralosti hlízy

Zdroj proměnlivosti	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F vypočtené	Hladina $p^1$	Podíl z celkové proměnlivosti [%]
Odrůdy (A)	2,169	1	1,169	68,30**	0,000	0,570
Termín odběru (B)	780,312	5	156,062	4917,60**	0,000	75,790
Interakce AxB	195,958	5	39,192	1235,00**	0,000	19,030
Chyba	1,523	48	0,032	-	-	-
<b>Celkem</b>	<b>1090,895</b>	<b>143</b>	<b>205,923</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

1)  $p$ -hodnota je hladina pravděpodobnosti:  $< 0,05$  popř.  $< 0,01$ , statisticky významný (\*) popř. velmi významný rozdíl (\*\*).

**Tabulka č. 10** - Korelační analýzy mezi sledovanými parametry u obou odrůd

ADORA	Dny po vzejití	prům. hmotnosti hlíz	sušina	obsah N-látek	obsah proteinů
Dny po vzejití	1,00	0,95*	0,68	-0,64	-0,79*
prům. hmotnost hlíz	0,95*	1,00	0,82*	-0,69	-0,84*
Sušina	0,68	0,82*	1,00	-0,82*	-0,94*
obsah N-látek	-0,64	-0,69	-0,82*	1,00	0,85*
obsah proteinů	-0,79*	-0,84*	-0,94*	0,85*	1,00
BIONTA	Dny po vzejití	prům. hmotnosti hlíz	sušina	obsah N-látek	obsah proteinů
Dny po vzejití	1,00	0,98*	0,73	-0,87*	-0,84*
prům. hmotnost hlíz	0,98*	1,00	0,65	-0,77	-0,73
Sušina	0,73	0,65	1,00	-0,90*	-0,91*
obsah N-látek	-0,87*	-0,77	-0,90*	1,00	0,95*
obsah proteinů	-0,84*	-0,73	-0,91*	0,95*	1,00

**Tabulka č. 11 - Korelační vztahy mezi hlízovými proteiny a růstovou fází (dny po vzejití) u obou odrůd**

	<b>Adora</b>	<b>Dny po vzejití</b>	<b>Patatin %</b>	<b>IP suma %</b>
<b>Adora</b>	1,00	0,99*	-0,84*	0,85*
<b>Dny po vzejití</b>	0,99*	1,00	-0,83*	0,84*
<b>Patatin %</b>	-0,84*	-0,83*	1,00	-0,80*
<b>IP suma %</b>	0,85*	0,84*	-0,80*	1,00
	<b>Bionta</b>	<b>Dny po vzejití</b>	<b>Patatin %</b>	<b>IP suma %</b>
<b>Bionta</b>	1,00	0,99*	-0,85*	0,96*
<b>Dny po vzejití</b>	0,99*	1,00	-0,85*	0,97*
<b>Patatin %</b>	-0,85*	-0,85*	1,00	-0,88*
<b>IP suma %</b>	0,96*	0,97*	-0,88*	1,00

## **6. DISKUZE**

### **6. 1. Proteinové profily jednotlivých vrstev hlízy - vyhodnocení elektroforeogramů**

Směrem ke středu hlízy dochází ke snižování obsahu proteinů, největší obsah proteinů byl zjištěn v korové vrstvě – odběry vzorků pod slupkou. RYBÁČEK (1988) uvádí, že nejbohatší na dusík jsou buňky pod slupkou a střed hlízy, shoduje se i s jinými autory (MÍČA, VOKÁL 1997), kteří uvádějí, že výrazná část N-látek je uložena v oblasti slupky a v srdéčku. Výsledky však ukazují, že střed hlízy – dřev a srdéčko vykazují nejnižší obsah proteinů z celé hlízy. Tyto rozdíly v tvrzeních mohou být způsobeny různými metodami stanovení proteinů ve vrstvách hlíz u jednotlivých autorů.

Z praktického hlediska je významný i fakt, že během kuchyňské úpravy hlíz (odstraněním slupky), dochází ke ztrátám velké části hodnotných bramborových proteinů (BÁRTA 2002).

### **6. 2. Proteinové profily hlíz v průběhu vegetace - vyhodnocení elektroforeogramů**

#### **Patatinový komplex**

Výsledky pokusu ukazují, že obsah proteinů patatinového komplexu v hlízách v průběhu vegetace klesá, záporný korelační koeficient mezi obsahem patatinu a růstovou fází (dny po vzejití) – u odrůdy Adora  $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ , u odrůdy Bionta  $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ . U všech dusíkatých složek dochází v průběhu vegetace ke snižování jejich obsahu v hlízách (KOLBE, STEPHAN-BECKMANN 1997). Ve vzorcích hlíz odebraných při sklizni byl zjištěn obsah proteinů patatinového komplexu z celkového proteinu hlízy u odrůdy Adora 25 %, u odrůdy Bionta 18 %. Někteří autoři (JIMENEZ et al. 2002) uvádějí, že ve zralých bramborových hlízách obvykle tvoří patatin 30 - 40 % rozpustných bílkovin. Obsah dusíkatých látek včetně bílkovin v hlízách brambor závisí především na odrůdě, hnojení, agrotechnických a klimatických podmínkách (SHEWRY 2003), což může tento rozdíl v tvrzeních vysvětlit.

### **Inhibitory proteáz**

Výsledky pokusu ukazují, že obsah inhibitorů proteáz v hlízách v průběhu vegetace stoupá, kladný korelační koeficient mezi obsahem inhibitorů proteáz a dobou odběru vzorků (dny po vzejití) – u odrůdy Adora  $r = 0,84$ ;  $p < 0,05$ , u odrůdy Bionta  $r = 0,97$ ;  $p < 0,05$ . To může být vysvětleno funkcí těchto proteáz v rostlině, které hrají u rostlin významnou roli v obranných mechanismech proti atakujícímu hmyzu a mikroorganismům a v hlízách se akumulují jako zásobní bílkoviny (BÁRTA, ČURN 2004).

### **6. 3. Stanovení obsahu proteinů v ostatních orgánech rostliny brambor**

Dle výsledků se nejvyšší obsah proteinů (stanoveno v sušině) kumuluje v rostlině bramboru v květech (17,21 % - zjištěno u odrůdy Bionta) a listech (12,05 % u odrůdy Adora; 14,95 % u odrůd Bionta - 4. odběr 21.7. 2006). Velký obsah proteinů v listech může být vysvětlen přítomností fytochromu - fotoreverzibilní chromoprotein s molekulovou hmotností 250 kDa, který se nachází ve všech rostlinných orgánech (PROCHÁZKA et al. 1998) ale hlavně přítomností enzymu ribulosa - 1,6-bisfosfátkarboxylasy (rubisco), který je patrně nejhojnějším proteinem na planetě (VSCHT), jeho molekulová hmotnost je 55 kDa (QI-WEN NIU 2006). Pomocí softwaru BioProfil, byl na základě plochy vrcholu stanoven procentický podíl bílkovinné frakce v oblasti 250 kDa odpovídající fytochromu u Adory na 1,17%, u Bionty na 2,67% a bílkovinné frakce v oblasti 55 kDa odpovídající rubiscu u Adory na 9%, u Bionty 8,7%.

Vysoký obsah proteinů zjištěný v květech může být vysvětlen přítomností pylu ve vzorku, který obsahuje podle druhu rostliny až 46 % stravitelných bílkovin (ŠKROBAL et al. 1970)

V ostatních částech rostliny jsou koncentrace proteinu téměř zanedbatelné. Koncentrace proteinů ve stoncích, stolonech a kořenech nepřesahuje 1%.

### **6. 4. Obsah N-látek a obsah bílkovin v hlíze**

Výsledky pokusu ukazují, že obsah N-látek se v hlízách během vegetace mění, u všech dusíkatých složek dochází v průběhu vegetace ke snižování jejich obsahu v hlízách. Nejnižších obsahů dusíkatých složek je dosahováno kolem 90. dne po vzejití

rostliny-období maximálního nárůstu hmoty hlíz (KOLBE, STEPHAN-BECKMANN 1997).

Toto období odpovídá fázi růstu 5 (hmotnost biomasy hlíz dosahuje u našich odrůd 63 – 79% z biomasy celé rostliny). V této fázi růstu byl u odrůdy Adora proveden předposlední odběr (88 dní po vzejití) a obsah N-látek v této růstové fázi byl 8,1%. V porovnání s předchozím a následným odběrem byl obsah N-látek skutečně nejnižší.

U odrůdy Bionta byl ve fázi růstu 5 proveden poslední odběr - 92 dní po vzejití. Obsah N-látek při tomto odběru byl 5,44 % a v porovnání se všemi ostatními odběry v průběhu vegetace byl nejnižší, jednalo se však o poslední odběr u této odrůdy, která ještě pokračovala v další tvorbě biomasy, a proto chybí porovnání s následným vývojem obsahu N-látek. Výše uvedené se shoduje také s tvrzením, že rané odrůdy vykazují vyšší obsah N-látek než odrůdy pozdní (MÍČA, VOKÁL 1997) a také s tím, že z faktorů podílejících se na variabilitě obsahů N-látek v hlíze má největší vliv genotyp. Byl uveden 30 % podíl odrůdy na variabilitě proteinového dusíku (MÍČA 1986).

Mezi obsahem N-látek a obsahem proteinů v bramborách existuje významný pozitivní vztah, dle pokusu (HRUŠKA et al., 1974) z výsledků souboru 90 odrůd byla zjištěna korelace +0,66. Korelační analýza mezi obsahem N-látek a obsahem proteinů u odrůdy Adora prokázala kladný korelační vztah ve výši  $r = 0,85$ ;  $p < 0,05$ , u odrůdy Bionta  $r = 0,95$ ;  $p < 0,05$ . U odrůdy Adora byl také prokázán negativní korelační vztah mezi obsahem proteinů a průměrnou hmotností hlíz ( $r = -0,84$ ;  $p < 0,05$ ). Z uvedeného vyplývá, že se změnou proteinů v průběhu vegetace souvisí také velikost hlíz. Uvádí se, že hlízy menší velikosti obsahují větší množství N-látek (KOLBE, STEPHAN-BECKMANN 1997).

Velmi významným faktorem ovlivňujícím obsah proteinů hlízy je hnojení dusíkem. Vyšší dávky dusíku zvyšují obsah proteinů v hlíze brambor (MÍČA, VOKÁL 1997)

## **6. 5. Obsah sušiny hlíz**

Statistické vyhodnocení výsledků neprokázalo závislost mezi obsahem sušiny a termínem odběru vzorků (dny po vzejití) ale i přesto je korelační koeficient poměrně vysoký, což poukazuje na pozitivní vývoj sušiny během vegetace (korelační analýza u Adory  $r = +0,68$ ;  $p < 0,05$ ; u Bionty  $r = +0,73$ ;  $p < 0,05$ ). Jako průkazný byl označen vztah mezi sušinou a prům. hmotností hlíz u odrůdy Adora ( $r = 0,82$ ;  $p < 0,05$ ).

Největší intenzita tvorby sušiny je v období mezi plným květem a odkvětem rostliny, kdežto v období mezi odkvětem rostliny a zráním je tato intenzita nižší (KOLBE, STEPHAN- BECKMANN 1997). Období mezi plným květem a odkvětem rostliny odpovídá fázi růstu 2 (intenzivní růst orgánů natě, kořenů, hlíz, počátek květu) až fázi růstu 4 (pokles hmoty nadzemní části, kořenů, zvětšování biomasy hlíz). Výsledky pokusu to potvrzují – ve fázi růstu 2 dosahovala odrůda Adora 14,95 % sušiny, odrůda Bionta 19,35 %. Ve fázi růstu 3 - odrůda Adora 21,02 % sušiny, odrůda Bionta 21,99 %. Ve 4. a 5. fázi růstu dochází k pozvolnému poklesu obsahu sušiny v hlízách u obou odrůd. Ale celkově má velmi raná odrůda Adora nižší obsah sušiny než odrůda polopozdní Bionta. Tyto výsledky se shodují s některými autory, kteří uvádějí, že odrůdy rané mají nižší obsah sušiny než odrůdy pozdní (ZRŮST, HOLÁ 1994; DEBRE, BRINDZA 1996; JŮZL et al. 2000).

Z uvedeného je patrné, že obsah sušiny hlíz je ovlivněna odrůdou a to z 81,58 % (RYBÁČEK et al. 1988). Výše obsahu sušiny je dále ovlivněna z 10,85 % prostředím (RYBÁČEK et al. 1988), spolu se zářením je teplota nejdůležitějším vnějším faktorem ovlivňujícím růst a vývin rostlin bramboru. Vysoké srážky a oblačné počasí v období tvorby hlíz (růstová fáze 2, 3) podmiňují nízkou sušinu hlíz (VOKÁL et al. 2000). Růstová fáze 2 a 3 se překrývají s obdobím vysokých srážek v červnu a proto se domnívám, že faktor počasí ovlivnil obsah sušiny hlíz.

## **6. 6. Průměrná hmotnost hlíz**

Kladný regresní vztah (Adora  $r = +0,95$ ;  $p < 0,05$ ; Bionta  $r = +0,98$ ;  $p < 0,05$ ) vypovídá o tom, že průměrná hmotnost hlíz narůstá v závislosti na délce vegetační doby (ZRŮST 1994).

Vliv na změnu průměrné hmotnosti hlíz mají i jiné faktory než jen délka vegetační doby. Někteří autoři (RYBÁČEK et al. 1988, VOKÁL et al. 2003) se shodují, že na průměrnou hmotnost hlíz působí příznivě vyšší teploty a rovnoměrně rozložené srážky během vegetace.

V roce 2006 byly srážky v období vegetace v porovnání s normálem (1961-1990) v průměru o 100 mm vyšší v červnu a srpnu. Toto období se překrývá s růstovou fází 1A a růstovou fází 4. V růstové fázi 1A dochází k zakládání stolonů, SLABÝ a KREJČÍ (2005) ve své práci uvádějí, že vlhké prostředí umožňuje metamorfózu stonku v hlízu a

indukuje tím proces tvorby hlíz. V růstové fázi 4 dohází k poklesu nadzemní biomasy rostliny a v tomto období je dosažen maximální počet hlíz (KOLBE, STEPHAN-BECKMANN 1997). Vzhledem k průběhu počasí v těchto fázích růstu významných pro tvorbu biomasy hlíz se domnívám, že na průměrnou hmotnost hlíz měly vliv právě vysoké srážky v těchto růstových fázích. Zároveň byl růst rostlin negativně ovlivněn i vysokými teplotami během vegetace viz. obr. 6. Celkově tedy nebyl ročník 2006 pro pěstování brambor příliš příznivý.

Mezi jednotlivými odrůdami však existují značné rozdíly v reakci na počasí. Některé odrůdy brambor reagují méně výrazně, početnější je však skupina odrůd, které reagují velmi silně (RASOCHA et al. 2005).

Na základě výsledků jednocestné analýzy rozptylu je možné potvrdit tvrzení, že se průměrná hmotnost hlíz liší v závislosti na odrůdě.

## 7. ZÁVĚR

Na základě výsledků jednoletého pokusu, ve kterém byl sledován obsah sušiny, N-látek a bílkovin u vybraných odrůd brambor s odlišnou délkou vegetační doby lze vyvodit tyto závěry:

- Obsah proteinů patatinového komplexu v hlízách v průběhu vegetace klesá, záporný regresní koeficient mezi obsahem patatinu a růstovou fází (dny po vzejití) – u odrůdy Adora  $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ , u odrůdy Bionta  $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ .
- Kladný regresní koeficient mezi obsahem inhibitorů proteáz a růstovou fází (dny po vzejití) – u odrůdy Adora  $r = 0,84$ ;  $p < 0,05$ , u odrůdy Bionta  $r = 0,97$ ;  $p < 0,05$ .
- Největší obsah proteinů byl zjištěn v korové vrstvě hlízy, nejnižší ve dřeni a srdéčku.
- Nejvyšší obsah proteinů v rostlině bramboru se kumuluje v květech (17,21 % - zjištěno u odrůdy Bionta) a listech (12,05 % u odrůdy Adora; 14,95 % u odrůdy Bionta).
- Koncentrace proteinů ve stoncích, stolonech a kořenech nepřesahuje 1%.
- U odrůdy Adora byl prokázán negativní regresní vztah mezi obsahem proteinů a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = -0,79$ ;  $p < 0,05$ , obsahem proteinů a průměrnou hmotností hlíz ( $r = -0,84$ ;  $p < 0,05$ ), obsahem proteinů a sušinou ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ).
- Kladný korelační koeficient byl u odrůdy Adora prokázán mezi obsahem proteinů a obsahem N-látek ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ), sušinou a průměrnou hmotností hlíz ( $r = 0,82$ ;  $p < 0,05$ ).
- U odrůdy Bionta byl prokázán negativní regresní vztah mezi obsahem proteinů a růstovou fází (dny po vzejití):  $r = -0,84$ ;  $p < 0,05$ , obsahem proteinů a sušinou ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ) a obsahem N-látek a sušiny ( $r = -0,90$ ;  $p < 0,05$ ).
- Kladný korelační koeficient by u odrůdy Bionta prokázán mezi obsahem proteinů a obsahem N-látek ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,05$ ).
- U obou sledovaných odrůd dochází v průběhu vegetace k poklesu N-látek – Adora na počátku vegetace: 13,68%, na konci vegetace 9,45%, Bionta na počátku vegetace 15,91 %, při posledním odběru 5,44%
- Raná odrůda Adora vykazuje vyšší obsah N-látek než odrůda polopozdní Bionta – při posledním odběru – 9,45 % Adora, odrůda Bionta – 5,44 %



- Průměrná hmotnost hlíz je závislosti na odrůdě a délce vegetační doby – kladný regresní vztah mezi průměrnou hmotností hlíz a růstovou fází (dny po vzejití): Adora  $r = +0,95$ ;  $p < 0,05$ ; Bionta  $r = +0,98$ ;  $p < 0,05$ .

Pro detailnější studium variability hlízových proteinů by bylo potřebné získat výsledky z víceletého pokusu, případně i výsledky z rozdílných lokalit s odlišnými stanovištními podmínkami.

## **8. LITERATURA**

- [1] AL – Saikham, M. S., Howard, L. R., Miller, JR. J. C (1995): Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.) *Journal of Food Science*, 60: 341 – 373.
- [2] Andrews, A., T. (1993): *Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. – Oxford Univ. Press, New York.
- [3] ANONYM (1986): *Kvalita stolních a konzumních brambor a její ovlivnění*. 1.vydání. Havlíčkův Brod,: Socialistická akademie
- [4] ANONYM 1. (2007): *Vysoká škola chemicko-technologická* [online], poslední revize 2. 3. 2007 [cit. 20. března 2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz>>.
- [5] Bárta, J.: *Charakteristika enzymového a bílkovinného spektra v hlízách brambor pomocí elektroforézy* (1997): diplomová práce. České Budějovice: ZFJU, 83 S.
- [6] Bárta, J., Čurn, V. (2004): *Bílkoviny hlíz brambor ( Solanum tuberosum L.)*, *Chemické listy*. 98(2), 5. 373 – 378. Texas. Česká spol. chemická 0009 – 2770
- [7] Čurn, V., Sáková, L., Graman, J. (1995): *Elektriforéza izoenzymů a neenzymatických bílkovin – metody a aplikace v genetice a šlechtění rostlin*, 31 (3), pp. 207 - 228
- [8] Bárta, J. (2002): *Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor*. Disertační práce, ZF JU, České Budějovice
- [9] Bílková, K., Králová, B.(1999): *Izolace biomakromolekul*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 206s. ISBN 80-7080-288-X
- [10] Čermák, V. (2006): *Přehled odrůd 2006: brambory*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně, 132 s. ISBN 80-86548-82-1
- [11] Debre, F., Brindza, J. (1996): *Genotypy zemiakov z pohľadu produkcie a užitkovej hodnoty*. *Rostlinná výroba*, 42, 11: 509 – 515.
- [12] Dobiáš, K., Míča, B. (1985): *Vliv odrůdy a místa pěstování na obsah sušiny u brambor*. *Rostlinná výroba*, 31, 1: 69 – 76.
- [13] Garfin, D. E. (2000): *Electrophoretic Methods*, firemní literatura firmy BIO-RAD, Academic Press and Hartcourt Science and Technology Company

- [14] Gilar, M., Bouvier, E. S. P., Compton, B. J. (2001): Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. *Journal of Chromatography A*, vol. 909, pp. 111-135. ISSN 0021-9673
- [15] Graman, J., Černý, J., Houba, M., Beran, J. , a kol. (1996): semenářství.1. vyd. – Skriptum, České Buějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 183 s. ISBN 80-7040-183-4
- [16] Herraiz, T. (1997): Sample preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides. *Analytica Chimica Acta*, vol. 352, pp. 119-139. ISSN 0003-2670
- [17] Hirschberg, H., Simons, J., Dekker, N., Edmond, M. (2001): Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *European Journal of Biochemistry*, 268: 5037 – 5044.
- [18] Chiou, S.-H., Wu, S.-H.: Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology,
- [19] Churáček, J. (1993): *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1.vyd. Praha: Academia, 387 s. ISBN 80-200-0010-0
- [20] Churáček, J. a kol. (1990): *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 384 s. ISBN 04-626-90
- [21] Integrace biologických a nebiologických systémů – nanobiotechnologie, ústav molekulární chemie AV ČR
- [22] Jimenez, M., Escribano, J., Gaudia, F., – Herrero, F., Chazara, S., Cabanes, J., Garcia Carmona, F., Perez – Gilbert, M. (2002): Characterization of patatin esterase activity in AOT – isooctane reverse micelles. *Biotechnology Progress*, 18: 635 – 640
- [23] Jůzl, M., Pulkrábek, J., Diviš, J. (2000): Rostlinná výroba (Díl 3.) okopaniny. 1. vyd. Brno: MZLU, 222 s. ISBN 80-7157-446-5
- [24] Kajiwara, H. (1999): Affinity capillary electrophoresis of proteins and peptides. *Analytica Chimica Acta*, vol. 383, pp. 61 – 66. ISSN 0003-2670
- [25] Kolbe, H., Stephan-Beckmann, S. (1997): Development, growth and chemical composition of potato crop (*Solanum tuberosum L.*). II. Tuber and whole plant. *Potato Research*, 40: 135 – 153.
- [26] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T. (2001): *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, 254 s. ISBN 80-7080-449-1

- [27] Li, S., H., Satyre, K., D. (1975): The protein, non-protein and total nitrogen in *Solanum tuberosum*, ssp. *Andigena* potatoes. *Američan Potato Journal*, 52: 341 – 350.
- [28] Mayer, H. (2001): Bitterness in processed cheese caused by an overdose of a specific agent. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 533-542. ISSN 0958-6946  
*Analytica Chimica Acta*, 1999, no. 383, pp. 47-60. ISSN 0003-2670
- [29] Mignery, G., A., Pikard, 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: 7987 – 8000.
- [30] Míča, B. (1986): Kvality brambor. In: *Kvalita stolních a konzumních brambor a její ovlivnění*. Škrobárny o.p., Havlíčkův Brod, 5-27
- [31] Míča, B., Vokál, B. (1997): Dusíkaté látky a jejich vztah ke kvalitě brambor. *Bramborářství*, 5: 5 – 8.
- [32] Ondřej, M. (1992): *Genové inženýrství kulturních rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 232 s.
- [33] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. (1998): *Fyziologie rostlin*. 1. vydání. Praha, Academia Praha. 426 – 429.
- [34] Prosser, V., et al.: *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Praha: 1989, Nakladatelství Československé akademie věd.
- [35] Pohl, T. (1990): Concentration of proteins and removal of solutes. IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): *Methods in enzymology*, Vol. 182: *Guide to protein purification*. Academic Press Inc., San Diego, Chapter 7: 68 - 83.
- [36] Pots, A., M., Gruppen, H., Diepenbek van, R., Lee van der, J., J., Boekel van, M., A., J., S., Wijngaards, G., Vpraven, A., G., J. (1999): The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI 10F mass spektrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1557 – 1564.
- [37] Pots, A., M., Jongh de H., H., J., Gruppen, H., Hessing, M., Vpraven, A., G., J., (1998): The pH dependence of the structural stability of patatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46: 2546 – 2553.
- [38] Pouvreau, L. (2004): *Occurrence and physico – chemical properties of protease inhibitors from potato tuber*. Wageningen University, Wageningen

- [39] Racusen, D.(1984): Lipid acyl hydrolase of patatin. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 62: 1640 – 1644.
- [40] Rasocha, V., Hausvater, E., Doležel, P.: Vliv počasí na výnosy a počet nasazených hlíz brambor. *Úroda* (2005): časopis pro rostlinnou produkci, 3, 4: 52-55
- [41] Rybáček, V., a kol. (1988): *Brambory*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- [42] Rydel, T., J., Williams, J., M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W., C., Browen, S., M., Pershing, J., C., Purcell, J., P., Alibhai, M., F.(2003): The crystal structure, mutagenesis and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser – Asp catalytic dyad. *Biochemistry – Washington*, 42: 6696 – 6708.
- [43] Shewry, P., R.: *Ann. Bot.* 91, 755 (2003)
- [44] Schulzová, V., Hajšlová, J., Roztočil, T., Voldřich, M.(1992): Stanovení obsahu glykoalkaloidů  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu v bramborách metodou HPLC., 10 (4): 281-292
- [45] Senda, K., Yoshioka, H., Dooke, N., Kawakita, K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant and Cell Physiology*, 37: 347 - 353.
- [46] Seppala, 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 Immunology*, 103: 165 – 171.
- [47] Slabý K, Krejčí P. (2005): *Anatomie a morfologie rostlin - návody do cvičení*. MZLU v Brně
- [48] Sommer, L. (2000): *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [49] Škrobal, D., a kol.(1970):*Včelařův rok*,Státní zemědělské nakladatelství Praha, s. 330
- [50] Šmálik, M. (1987): *Zemiaky*. Příroda, Bratislava, 304 p.
- [51] Špaldoň, E. a kol.(1982): *Rostlinná výroba*.1. vyd. Bratislava: Příroda, 714 s
- [52] Tonon, C., Daleo, G., Oliva, C. (2001): An acidic  $\beta$ -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 849 – 854.
- [53] Tsuda, T., Yamada, M., Nakazawa, Y. (1993): Measurement of lower molecular weight peptides in Camembert cheese using a computer simulation system of capillary isotachopheresis. *Milchwissenschaft*, vol. 48, no. 2, pp. 74-78. ISSN 0026-3788
- [54] Vaňková, H. (1999): Peptidové mapy. *Chemické Listy*, roč. 93, s. 120-127. ISSN 0009-2770

- [55] Vodrážka, Z. (2002): Biochemie. 2. vyd. Praha: Academia, 180,135,191 s. ISBN 80-200-0600-1
- [56] Vokál, B. a kol. (2000): Brambory. Praha: Agrospoj, 245 s.
- [57] Vokál, B.: Naše bramborářství na prahu roku 2005. Úroda, Profi Press, s.r.o., 2005,53, (1): 3 – 4.
- [58] Westermeier, R. (2001): Electrophoresis in Practice – A guide to methods and applications of DNA and protein separations, third edition, WILEY-VCH Verlag GmbH, FRG,
- [59] Zrůst, J. (2004): Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor. VVF
- [60] Zrůst, J., Holá, Z. (1994): The effect of drought stress on some qualitative indexes of potato – tubers. Rostlinná výroba, 40, 3: 261 – 270.

## **SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka č. 1</b> - Rozdělení jednotlivých frakcí dusíkatých látek v hlíze brambor .....	12
<b>Tabulka č. 2</b> - Obsah glykoalkaloidů v rostlině a hlízách .....	13
<b>Tabulka č. 3</b> - Změny dusíkatých látek během růstu bramborové hlízy .....	17
<b>Tabulka č. 4</b> - AZP před výsadbou pokusu .....	24
<b>Tabulka č. 5</b> - Charakter průběhu polního pokusu (dle Raeuber et Engel), pozemek ZF JČU České Budějovice .....	26
<b>Tabulka č. 6</b> - Složení roztoků pro SDS – PAGE (denaturační systém) .....	31
<b>Tabulka č. 7</b> - Množství čistého proteinu jednotlivých orgánů rostliny bramboru v %, zjištěných při 4. odběru 21. 7. 2006.....	37
<b>Tabulka č. 8</b> - Množství čistého proteinu jednotlivých orgánů rostliny bramboru v %, zjištěných při 6. odběru 21. 8. 2006.....	38
<b>Tabulka č. 9</b> - Analýza rozptylu – hlavních efektů obsahu dusíku u ověřovaných odrůd brambor v různých fázích vývinu a zralosti hlízy.....	43
<b>Tabulka č. 10</b> - Korelační analýzy mezi sledovanými parametry u obou odrůd.....	43
<b>Tabulka č. 11</b> - Korelační vztahy mezi hlízovými proteiny u obou odrůd.....	44

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

<b>Obrázek č. 1</b> - Schéma přibližného rozložení hlavních látek v bramborové hlíze na příčném (a) a podélném (b) řezu .....	12
<b>Obrázek č. 2</b> - Vývojová stádia bramboru .....	15
<b>Obrázek č. 3</b> - Průběh přírůstku sušiny bramborů.....	16
<b>Obrázek č. 4</b> - Změny v obsahu hlavních látek bramborové hlízy v průběhu vegetace	17
<b>Obrázek č. 5</b> - Průměrné srážky a teploty za r. 2006.....	27
<b>Obrázek č. 6</b> - Průměrné měsíční teploty vzduchu ve °C za rok 2006 v porovnání s normálem (1961-1990).....	28
<b>Obrázek č. 7</b> - Srovnání průměrných měsíčních úhrnů srážek v mm za rok 2006 s normálem (1961-1990).....	28
<b>Obrázek č. 8</b> - Nákres odběru vzorků z hlízy .....	29
<b>Obrázek č. 9</b> - Kvantifikace bílkovin patatinového komplexu pomocí softwaru BioProfil.....	31
<b>Obrázek č. 10</b> - Ukázka zbarvení kalibračních standardů o různé koncentraci hovězího sérového albuminu (BSA $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).....	32
<b>Obrázek č. 11</b> - Proces stanovení obsahu dusíku na přístroji Flash EA 1112 (ThermoQuest, 1999).....	33
<b>Obrázek č. 12</b> - Změny obsahu proteinů v jednotlivých vrstvách hlízy bramboru u odrůdy Adora v % .....	34
<b>Obrázek č. 13</b> - Změny obsahu proteinů v jednotlivých vrstvách hlízy bramboru u odrůdy Bionta v % .....	35
<b>Obrázek č. 14</b> - Proteinová spektra jednotlivých vrstev hlíz.....	35
<b>Obrázek č. 15</b> - Změna proteinové spektra hlízy bramboru u odrůdy Adora v průběhu vegetace .....	36
<b>Obrázek č. 16</b> - Změna proteinové spektra hlízy bramboru u odrůdy Bionta v průběhu vegetace .....	37
<b>Obrázek č. 17</b> - Změna obsahu čistého proteinu v průběhu vegetace .....	39
<b>Obrázek č. 18</b> - Změna obsahu N-látek ( $\text{N} \times 2,6$ ) v průběhu vegetace .....	40
<b>Obrázek č. 19</b> - Změna obsahu sušiny v průběhu vegetace.....	41
<b>Obrázek č. 20</b> - Změna hmotnosti hlíz v průběhu vegetace .....	42



