

Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Adéla BRABCOVÁ
Narozen(a): 19. 6. 1987 v Českých Budějovicích
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 4. 2. 2016, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a
planých druhů brambor

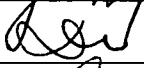
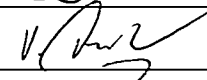
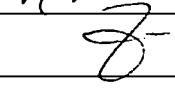
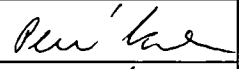
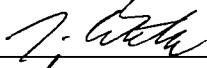
Výsledek obhajoby:

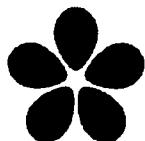
Prospěl (a) 

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; Mendelova univerzita v Brně	
Členové:	Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D.; VÚB Havlíčkův Brod (oponent)	
	Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.; VÚRV Praha (oponent)	
	doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.; Masarykova univerzita (CEITEC) (oponent)	
	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel:	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Adéla BRABCOVÁ
Narozen(a): 19. 6. 1987 v Českých Budějovicích

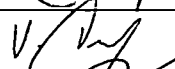
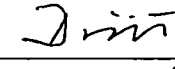
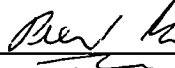
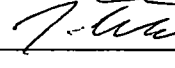
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8 počet přítomných členů komise: 7
počet platných hlasů: 7 kladných: 7
záporných: 0
počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; Mendelova univerzita v Brně	
Členové:	Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D.; VÚB Havlíčkův Brod (oponent)	
	Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.; VÚRV Praha (oponent)	
	doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.; Masarykova univerzita (CEITEC) (oponent)	
	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	OMLUVEN
	doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	

Vypracované odpovědi na otázky oponentů k disertační práci Ing. Adély Brabcové

Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor

Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D.

Jakou máte představu o využití netradičních planých druhů v procesu novošlechtění bramboru? Jakým způsobem by mohly být jednotlivé druhy využity? Jak ovlivní jejich využitelnost úroveň ploidie?

Využití planých druhů bramboru v procesu novošlechtění lze spatřovat zejména v rezistentním šlechtění. Plané druhy bramboru jsou zdrojem genetické diversity a mohou sloužit jako donoři nejrůznějších kvalitativních vlastností. Jako příklady lze uvést plané druhy *S. demissum* a *S. stoloniferum*, ze kterých byly přeneseny geny rezistence k *Phytophthora infestans* do evropských odrůd. Dále jsou z pohledu rezistentního šlechtění velmi zajímavé plané druhy *S. chacoense* a *S. acaule*, které poskytly geny rezistence k virům a druhy *S. vernei* a *S. spegazzinii* s geny rezistence proti háděnkám. V současné době se předmětem výzkumu staly nové zdroje jak polygenní (*S. microdontum* a *S. phureja*), tak monogenní rezistence (*S. berthaultii*, *S. pinnatisectum* a *S. bulbocastanum*). Velká pozornost je také věnována mexickým planým druhům, které sdílejí stejné prostředí s patogenem a mají vyvinuté mechanismy pro přežití. Jedná se např. o planý druh *S. bulbocastanum*, který vykazuje trvalou rezistenci, která je efektivní proti všem známým rasám plísně.

Úroveň ploidie má zásadní význam na využití planých druhů ve šlechtění. U rodu *Solanum* je totiž díky efektní ploidii, která je vyjádřena číslem vyváženosti endospermu (EBN), vyvinut silný mechanismus sexuální izolovanosti. Tyto bariéry křížitelnosti mohou být překlenuty zvýšením (polyploidizace, somatická fúze protoplastů) nebo snížením (regenerace rostlin z prašníků, partenogeneze) úrovně ploidie.

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Jaké byly hlavní optimalizační kroky při navržení finálního postupu dvoustupňové separace hlízových proteinů? Případně z jaké primární metodiky se vycházelo?

Princip základního postupu dvoustupňového systému purifikace je datován kolem roku 1980, kdy byl používán podobný postup. Hlavní optimalizační kroky spočívaly v navržení jednotné formy a úpravy vstupního materiálu (extrakce, filtrace vzorku a úprava pH), optimalizace poměru naneseného vzorku ku množství média v koloně a množství přidávané

mobilní fáze tak, aby nedocházelo ke ztrátám v průběhu purifikace a výsledem byl purifikovaný patatin v požadované kvalitě a čistotě.

V kap. č. 7 jste se pak podílela na vypracování metodiky měření aktivity inhibitorů proteáz. Jaké je přibližná opakovatelnost (chyba měření) v případě této spektrometrické metody?

V kapitole č. 7 jsem se podílela na vypracování metodiky měření specifické aktivity lipidacylhydrolasy patatinu, kde byla průměrná chyba měření 0,02.

Je známo něco konkrétnějšího o vztahu mezi úrovní alergenicity a spektru glykosylací patatinu?

N-glykany byly identifikovány v různých typech alergenů rostlinného (např. celer, jablko, ořechy, mák) a živočišného původu (jed hmyzu). Alergenní schopnost patatinu je výrazně snižována tepelnou úpravou a vztahu mezi její úrovní a spektrem glykosylací nebyla v této souvislosti podrobněji studována.

Jak obecně fungují určité agrotechnické zásahy (např. úroveň hnojení) na kvantitativní zastoupení patatinu? Lze očekávat nejen jeho absolutní, ale i relativní nárůst v hlíze při zvýšení dávek dusíku?

Z nedávno publikovaných výsledků (Bárta a kol. 2012), které byly zaměřené na sledování vlivu agroekologických faktorů na kvantitu a kvalitu bílkovin u odrůd brambor určených pro zpracování na škrob bylo zjištěno, že největší vliv má odrůda (genotyp) a to až z 50 %. Podíl přímého vlivu dalších sledovaných faktorů (vliv aplikace dusíkatých hnojiv, vliv ročníku, vliv stanoviště a charakteru půdy a způsob pěstování) na zastoupení patatinových bílkovin byl výrazně nižší (asi 13 %). Výrazněji byl sledován vliv dávky dusíku na zastoupení hlízových bílkovin. Obecně lze jednoznačně říci, že dostatečné hnojení dusíkem podporuje produkční procesy a rovněž i obsah dusíkatých látek a bílkovin (doporučená dávka dusíku pro optimální výnos bílkovin je 80-120 kg/ha). Obsah bílkovin v hlízách byl při aplikaci zvýšené dávky dusíku vyšší (v průměru o 12 %), nicméně vysoká dávka dusíku (200 kg/ha) spíše snižuje relativní zastoupení patatinu v celkovém bílkovinném spektru. Nelze tedy obecně říci, že vysoká dávka dusíku bude mít automaticky za následek i nárůst (absolutní i relativní) obsahu patatinu v hlíze.

Lze považovat signifikantní rozdíly v hodnotách EAAI u patatinu mezi testovanými genotypy jako jejich jednoznačný nutriční fingerprint jen s velmi malým vlivem externích faktorů?

Hodnota indexu esenciálních aminokyselin (EAAI) je dána sekvencí aminokyselin patatinu. Signifikantní rozdíly nutriční hodnoty patatinu lze tedy přisuzovat hlavně genotypu a proto se domnívám, že je možné brát rozdíly v hodnotách indexu esenciálních aminokyselin jako nutriční fingerprint.

Je možné v tomto směru nalézt či očekávat nějakou souvislost mezi strukturou glykosylace patatinu a sledovanou enzymatickou aktivitou, jejíž potenciální efekt autorka zmiňuje u antioxidační aktivity patatinu?

Výsledky měření úrovně molekulových hmotností izolovaných patatinů potvrdily 3 hmotnostní úrovně reprezentující 3 úrovně glykosylací. Ve většině případů se jednalo o odchylky 200 – 400 Da, ale i větší. V rámci hodnoceného souboru genotypů však neměly hmotnostní isoformy stejnou četnost. Tyto změny mohou být způsobeny záměnou aminokyselin v sekvenci patatinových polypeptidů, mohou být způsobeny změnami v počtu aminokyselin v sekvenci, nebo v genotypové variabilitě sacharidových antén. Vzhledem k tomu, že v rámci hodnocených genotypů byly nalezeny výrazné rozdíly v enzymových aktivitách patatinu tak lze očekávat, že právě strukturní rozdíly mají významný vliv.

Lze nějak porovnat (okomentovat) úroveň (příspěvek) této antioxidační aktivity patatinu (jeho štěpů) ve srovnání s uváděnými hlavními komponenty ovlivňující antioxidační aktivitu celé hlízy (polyfenoly, vitamin C, karotenoidy, tokoferoly aj.) ?

Bramborové hlízy jsou z antioxidantů nejbohatší na polyfenoly (flavonoidy, anthokyany, fenolkarboxylové kyseliny) a L-askorbovou kyselinu. Při porovnání antioxidační aktivity patatinu s hodnotami hlavních antioxidantů v hlíze, které jsou uvedeny v práci Lachman a kol. (2005) lze úroveň antioxidační aktivity patatinu přirovnat k ferulové kyselině. Při porovnání s uváděnou průměrnou hodnotou kyseliny askorbové je to asi 30x méně. U patatinových štěpů získaných po enzymatickém štěpení trypsinem lze jejich antioxidační aktivitu přirovnat k hlavním fenolickým kyselinám – chlorogenové a kávové, což je při porovnání s kyselinou askorbovou asi 4x méně. Patatinové štěpy získané štěpením alkalasou nelze přirovnat k žádné konkrétní sloučenině, protože převyšují asi 9x průměrnou hodnotu uvedenou pro celou skupinu polyfenolů.

Doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

Vysvětlete prosím, co znamená tvrzení „patatiny jsou glykoproteiny,..., kterou tato homogenní skupina izoform má.“ (str. 15). Z jakého pohledu je tato skupina homogenní?

Homogenní skupina je v tomto smyslu myšlena tak, že všechny genotypy bramboru obsahují patatin, který má molekulovou hmotnost 40-43 kDa a jedná se o skupiny glykoproteinů, která je jednotná ve své funkci a aktivitách (např. enzymových). Použitý termín spojení „homogenní isoformy“ však není nejvhodnější a je zavádějící.

Uveďte prosím výhody a případné nevýhody Vašeho postupu pro izolaci patatinových bílkovin oproti stávajícím postupům.

Hlavní výhodou navrženého dvoustupňového purifikačního kroku je čistota výsledného patatinu. Při izolaci patatinu dochází rovněž k izolaci basických (v prvním kroku) a kyselých (v druhém kroku) inhibitorů proteas, které lze rovněž následně použít pro další analýzy.

Jakou ze zjištěných vlastností u netradičních či planých brambor považujete za nejperspektivnější pro uplatnění v praxi (biotechnologické aplikace)?

U planých druhů bramboru lze zjištěné výsledky využít zejména ve šlechtění, protože se domnívám, že nelze předpokládat, že by se bílkoviny těchto druhů v nejbližší době využívali např. v potravinářství či medicíně. Význam v podstatě všech zjištěných vlastností bílkovin (patatinu) planých či netradičních kulturních druhů lze spatřovat zejména ve zlepšení vlastností komerčních odrůd a to jak z hlediska rezistentního šlechtění (enzymové aktivity), tak z hlediska využití v potravinářství např. jako konzervačních látek či dochucovadel s vyšší nutriční hodnotou (antioxidační aktivita).

Na str. 29/30 – rozpor v citaci Sonnewald et al. (1989) – na str. 29 je zmíněno – „... patatin exprimovaný v listech transgenního tabáku je glykosylovaný na dvou místech (asparagin 60 a asparagin 90)...“, zatímco na str. 30 u stejné citace je – „... po izolaci patatinu z transgenního tabáku (odrůda Berolina) 3 glykosylační místa v polypeptidovém řetězci v pozicích 37, 67 a 181...“ – prosím vysvětlete.

Glykosylace polypeptidového řetězce patatinu je skutečně pomocí asparaginových zbytků. Jejich pozice v sekvenci je pravděpodobně závislá na počtu glykosylací. Jsou uváděny dvě (Stiekema a kol., 1988) až tři (Sonnewald a kol., 1989) N glykosylační místa. Sonnewald a kol., 1989 našli u patatinu (odrůda Berlina) tři možná glykosylační místa v pozicích 37., 67. a 181. aminokyseliny od N-konce řetězce (po přičtení signálního peptidu se jedná o pozice 60, 90 a 202), přičemž třetí glykosylační místo (Asn 202) není glykan.

Věc: Zápis z obhajoby disertační práce Ing. Adély Brabcové

V rámci obhajoby disertační práce Ing. Adély Brabcové byla představena komise pro obhajobu disertační práce a bylo konstatováno, že kandidátka splnila veškeré náležitosti nutné pro zahájení obhajoby disertační práce. Následovalo přednesení stanoviska školitele a školícího pracoviště studentky, která obě byla pozitivní a bylo přistoupeno k prezentaci výsledků disertační práce zpracované na téma „Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor“. Po proběhlé prezentaci byly čteny posudky oponentů (Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D., Ing. Václav Dvořáček, Ph.D., doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Ph.D.), ve kterých bylo shodně konstatováno, že prezentované výsledky jsou velkým přínosem pro další vědecké i praktické zaměření práce v této oblasti a že práce byla zpracována velmi kvalitním způsobem. Po přečtení otázek oponentů, které studentka zodpověděla, bylo přistoupeno k všeobecné diskuzi.

V rámci této diskuze prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc. vznesl dotaz týkající se využitelnosti antioxidačních vlastností brambor při jejich šlechtění – bylo odpovězeno, že antioxidační vlastnosti patatinových proteinů a jejich proteinových štěpů jsou pravděpodobně geneticky fixovanou vlastností a je možnost tuto vlastnost ve šlechtění využít. Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc. vznesl dotaz týkající se stanovení ploidie sledovaných druhů bramboru a heritability sledovaných vlastností hlízových proteinů – v rámci odpovědi bylo vysvětleno jakým způsobem proběhlo stanovení ploidity analyzovaných druhů a genotypů a bylo konstatováno, že dle dosavadních výsledků se na kvantitě bílkovin podílí genotyp cca ze 30-50 % a zbývající podíl představuje kombinaci ostatních faktorů prostředí. Doc. Ing. Jiří Diviš, CSc. položil otázku týkající se možného vztahu mezi antioxidačními a chuťovými vlastnostmi patatinu a dál se zajímal o reálné možnosti využití planých a primitivních genotypů brambor v šlechtitelských programech. V rámci diskuze na toto téma bylo řečeno, že vztahy mezi popsányými vlastnostmi patatinu nebyly dosud zkoumány a neexistují na toto zajímavé téma žádné informace. Z hlediska využití planých genotypů ve šlechtění se jedná o velmi reálné možnosti, neboť tyto genotypy disponují celou řadou cenných vlastností, přesto je to proces velmi náročný s nutností investice až několik desítek let intenzivní šlechtitelské práce.