

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění

Stanovení glykoalkaloidů u somatických hybridů bramboru
(*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*)

Bakalářská práce

Autor práce: Aneta Vaňková

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Stanovení glykoalkaloidů u somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 3. 4. 2012

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. v první řadě za poskytnutí potřebného rostlinného materiálu, ale také za trpělivé vedení, ochotu, obětavou pomoc a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce.

Další poděkování patří Ing. Kateřině Hejtmánkové za její asistenci při praktickém měření glykoalkaloidů v laboratoři a ochotu kdykoliv poradit.

Neméně významná byla i pomoc Petra Starého, kterému taktéž patří velký dík, a to za cenné rady týkající se práce s počítačovými programy.

OBSAH	Str.
1. ÚVOD	6.
2. CÍL PRÁCE	7.
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	8.
3.1. ČELEĎ LILKOVITÉ	8.
3.1.1. LILEK BRAMBOR	8.
3.2. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ROSTLINNÝCH ALKALOIDŮ	9.
3.2.1. CHARAKTERISTIKA ALKALOIDŮ	9.
3.2.2. ROZDĚLENÍ ALKALOIDŮ	9.
3.2.2.1. PRAVÉ ALKALOIDY	11.
3.2.2.1.1. PYRIDINOVÉ, PIPERIDINOVÉ A PYRROLIDINOVÉ ALKALOIDY	11.
3.2.2.1.2. PYRROLYZIDINOVÉ ALKALOIDY	11.
3.2.2.1.3. CHINOLIZIDINOVÉ ALKALOIDY	11.
3.2.2.1.4. CHINOLINOVÉ ALKALOIDY	11.
3.2.2.2. PROTOALKALOIDY	12.
3.2.2.2.1. KAPSAICINOIDY	12.
3.2.2.3. PSEUDOALKALOIDY	12.
3.2.2.3.1. PURINOVÉ ALKALOIDY	12.
3.2.2.3.2. STEROIDNÍ GLYKOALKALOIDY	12.
3.3. GLYKOALKALOIDY BRAMBOR	13.
3.3.1. HODNOCENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ V HLÍZÁCH	15.
3.3.2. VLASTNOSTI GLYKOALKALOIDŮ	16.
3.3.2.1. TOXICITA	16.
3.3.2.2. POZITIVNÍ VLASTNOSTI	16.
3.3.2.3. VLIV GLYKOALKALOIDŮ NA ROSTLINU	17.
3.3.3. BIOSYNTÉZA A DEGRADACE GLYKOALKALOIDŮ	18.
3.3.4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH GLYKOALKALOIDŮ	19.
3.3.4.1. VLIV ROZMÍSTĚNÍ GLYKOALKALOIDŮ V ROSTLINĚ	20.
3.3.4.2. VLIV PĚSTEBNÍCH PODMÍNEK	21.
3.3.4.3. VLIV SKLADOVACÍCH PODMÍNEK	22.
3.3.4.4. VLIV MECHANICKÉHO POŠKOZENÍ	23.

3.3.4.5.	VLIV KULINÁRNÍCH ÚPRAV	23.
3.4.	METODY STANOVENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ	24.
3.4.1.	HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie)	24.
3.4.2.	GC (plynová chromatografie)	25.
3.4.3.	TLC (tenkovrstevná chromatografie)	25.
4.	MATERIÁL A METODY	26.
4.1.	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26.
4.2.	EXTRAKCE GLYKOALKALOIDŮ A JEJICH STANOVENÍ	27.
4.3.	STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	28.
5.	VÝSLEDKY	29.
6.	DISKUZE	37.
6.1.	POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ MĚŘENÍ S LEGISLATIVNÍM LIMITEM	37.
6.2.	ZHODNOCENÍ PRŮBĚHU MĚŘENÍ	37.
6.3.	PRAVDĚPODOBNOST VÝSKYTU MINORITNÍCH GLYKOALKALOIDŮ	38.
6.4.	HODNOCENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ DEVÍTIBODOVOU STUPNICÍ	39.
6.5.	HODNOCENÍ STATISTICKÝCH CHARAKTERISTIK	39.
6.6.	POTENCIÁL ZKOUMANÝCH GENOTYPŮ	40.
7.	ZÁVĚR	41.
8.	SEZNAM LITERATURY	42.
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	46.
10.	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	47.

1. ÚVOD

Brambory jsou jednou z nejvýznamnějších plodin světa, jelikož tvoří neopomenutelnou část lidské stravy. Podle FAO (2010) představují celosvětově přibližně 5,1 % z celkového příjmu energie. Pokud tuto hodnotu porovnáme s jinými zdroji potravy, je na podobné úrovni jako například mléko, vejce a ryby, které dohromady pokrývají 6,9 % energetického příjmu.

Z důvodu této vysoké konzumace je nutné věnovat bramborám značnou pozornost, proto stále probíhají procesy šlechtění této plodiny. Jejich účelem je získat co nejkvalitnější produkt vhodný pro lidskou stravu, který je zdravotně nezávadný, chutný a zároveň představuje zdroj nutričně významných látek (škrob, vitamíny). Také je velký zájem o produkci odrůd a kultivarů, které jsou rezistentní vůči různým škůdcům a chorobám, což usnadňuje práci zemědělcům a působí rovněž jako prevence proti výskytu přenosných chorob a škůdců.

V rámci tohoto šlechtění probíhají pravidelné kontroly obsahů jak zmíněných nutričně významných a žádaných látek, tak i látek, které mají negativní účinky na lidský organismus. Mezi tyto látky patří steroidní glykoalkaloidy, které jsou v hlízách kulturních odrůd tvořeny převážně solaninem a chaconinem. V bramborách se ale nalézají celá škála dalších alkaloidů, které bývají koncentrovány v jiných částech rostliny. Navíc k šlechtění bývají mnohdy používány plané druhy rodu *Solanum*, které napomáhají například ke zvýšení zmíněné rezistence rostlin proti patogenům. Tyto plané druhy vykazují velmi bohatou paletu glykoalkaloidů, které se po zkřížení s kulturní odrůdou mohou vyskytnout v generaci potomků. Z tohoto důvodu jsou kontroly obsahů těchto látek nezbytně nutné.

Tato práce, která je pojata jako vědecká práce, se zaměřuje na obdobné stanovení obsahu glykoalkaloidů v hlízách somatických hybridů brambor (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*). Získané informace mohou poskytnout představu o kvalitě sledovaných hlíz pomocí porovnávání s legislativními předpisy a jinými hodnotícími systémy.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vypracování všeobecného přehledu poznatků týkajících se problematiky glykoalkaloidů a následné stanovení obsahu glykoalkaloidů u 15 genotypů somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) s využitím metody HPLC.

Dalším cílem je statisticky zhodnotit získaná data a výsledky hodnocení za prvé porovnat s legislativním limitem, který povoluje maximální hladinu glykoalkaloidů 200 mg.kg⁻¹ čerstvých hlíz, a za druhé hodnocené genotypy klasifikovat devítibodovou stupnicí, kterou navrhl Zrůst (1999).

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. ČELEĎ LILKOVITÉ

Čeď lilkovitá (*Solanaceae*) zahrnuje, jak udává Slavík (2000), asi 96 rodů, které obsahují více než 2500 druhů, z nichž více než polovina je v rodu *Solanum*. V této čeledi se vyskytují jednoleté, dvouleté, víceleté i vytrvalé byliny, polokeře, keře a v tropech i menší stromy. Právě v tropických a v subtropických pásmech s těžištěm ve Střední a Jižní Americe se lilkovité rostliny vyskytují nejvíce, ale jelikož mezi ně patří i významné kulturní plodiny, nalézáme je i v mírných pásmech na obou polokoulích (Novák a Skalický, 2009).

Jedním z nejvýznamnějších druhů, patřících do této čeledi, je *Solanum tuberosum*. Tento druh zaujímá čtvrté místo v produkci potravin za pšenicí, kukuřicí a rýží. I další druhy se hojně využívají v potravinářství, jsou to např. druhy rodu *Capsicum*, *Lycopersicon* a *Physalis*. Další možné využití určitých druhů čeledi *Solanaceae* je v lékařství, farmacii a drogové terapii. Druhy rodu *Nicotiana* se pěstují pro tabákový průmysl. Jiné druhy se využívají jako okrasné rostliny, jedná se např. o rostliny rodu *Petunia* či *Physalis* (Slavík, 2000).

Z chemického hlediska je tato čeď významná kvůli obsahovým látkám, které se v lilkovitých rostlinách nacházejí. Jedná se v první řadě o jedovaté alkaloidy, ale také o polyfenoly, flavonoidy, kumariny, taniny, steroidní saponiny a sapogeniny, steroidní laktony, pentacyklické triterpeny a silice (Slavík, 2000).

3.1.1. LILEK BRAMBOR (*Solanum tuberosum*)

Tomšovic (2000) popisuje rostliny druhu *Solanum tuberosum* L. jako vytrvalé byliny (v ČR se však lilek brambor pěstuje jako jednoletá rostlina), které mají svazčité kořeny a podzemní hlízy. Novák a Skalický (2009) k tomu dodávají, že tyto hlízy se tvoří na oddenkových výběžcích, tzv. stolonech.

Brambory spolu s obilninami představují základ výživy lidstva v mírných pásmech a pěstují se pro podzemní stonkové hlízy, které obsahují vysoké množství sacharidů, z nichž převažuje škrob (Tomšovic, 2000). Dále se v hlízách nalézají bílkoviny či vitamíny C a B (Novák a Skalický, 2009).

Z důvodu značného využití brambor, a to nejen jako zdroje výživy člověka, ale také pro krmné účely či průmyslové využití (výroba lihu, škrobu), se tato rostlina již mnoho let šlechtí za účelem získání požadovaných vlastností. Nutnost tohoto šlechtění popisují i Tömösközi – Farkas et al. (2006), kteří dodávají, že jedním z cílů současného šlechtění

brambor je vyvinutí nových odrůd se zvýšenou rezistencí vůči patogenům a škůdcům. Také uvádějí, že zdroji této rezistence mohou být plané odrůdy brambor. Díky tomuto šlechtění existuje tedy mnoho kultivarů brambor, které se, jak udává Tomšovic (2000), člení podle zralosti hlíz (rané, polorané a pozdní) a podle použití (konzumní a průmyslové). Pro hodnocení kultivarů se používá bonitační systém, který ve své publikaci podrobně popisuje Vidner et al. (1987).

3.2. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ROSTLINNÝCH ALKALOIDŮ

3.2.1. CHARAKTERISTIKA ALKALOIDŮ

Definice pojmu alkaloidy se v průběhu let mnohokrát změnila. Wink (1997) uvádí, že dříve byly alkaloidy popisovány pouze jako rostlinné báze s heterocyklicky vázaným atomem dusíku, přičemž báze s dusíkem vázaným vně cyklu byly označovány jako pseudoalkaloidy. Jiné definice byly založeny na tom, že kostra alkaloidů by měla být odvozena od aminokyselin či že tyto báze mají farmakologické vlastnosti. Tyto varianty byly zjednodušeny a alkaloidy poté označovány jako všechny dusík obsahující přírodní látky, které nejsou jinak klasifikovány jako peptidy, nebílkovinné aminokyseliny, aminy, kyanogenní glykosidy, glukosinoláty, kofaktory, fytohormony nebo primární metabolity (jako například purinové nebo pyrimidinové báze).

Velíšek a Cejpek (2008) alkaloidy popisují jako sekundární metabolity obsahující dusík v negativním oxidačním stavu, které se nacházejí u 15 – 20 % cévnatých druhů rostlin ve volném stavu, jako soli rostlinných kyselin, jejich estery či amidy. Některé rostlinné alkaloidy jsou také kombinovány s cukry ve formě glykosidů.

3.2.2. ROZDĚLENÍ ALKALOIDŮ

Velíšek a Cejpek (2008) uvádějí, že je známo více než 10000 alkaloidů s tolika rozdílnými strukturami, jako neobsahuje žádná jiná skupina přírodních produktů. Z tohoto důvodu je velmi složité alkaloidy rozčlenit na menší celky. Nejčastěji se používá dělení podle základního dusík obsahujícího řetězce jejich struktury, ačkoliv ta je u některých alkaloidů mnohem složitější, a také podle jejich hlavních biosyntetických prekurzorů.

Podle těchto zásad dělíme alkaloidy do 3 základních skupin. Těmito skupinami jsou:

- a) pravé alkaloidy
- b) protoalkaloidy
- c) pseudoalkaloidy.

Další dělení uvnitř těchto tří skupin znázorňuje Tab. 1.

Tab. 1.: Přehled alkaloidů vyskytujících se v potravinách (Velíšek a Cejpek, 2008 – upraveno).

Strukturní typy (základní kostra)	Prekurzory	Důležité skupiny	Příklady
Pravé alkaloidy			
Pyridinové, piperidinové a pyrrolidinové alkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • arginin, lysin, ornitin, kyselina nikotinová • lysin, fenylalanin 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy tabáku • alkaloidy pepře 	<ul style="list-style-type: none"> • nikotin, nornikotin, anatabin, anabasin • piperin
Pyrrolyzidinové alkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • arginin, isoleucin, leucin, ornitin, valin, threonin 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy starčku 	<ul style="list-style-type: none"> • senecionin
Chinolizidinové alkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • lysin 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy lupiny 	<ul style="list-style-type: none"> • lupanin, lupinin, spartein
Chinolinové alkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • tryptofan, kyselina mevalonová 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy chinovníku 	<ul style="list-style-type: none"> • chinin, chinidin, cinchonidin, cinchonin
Protoalkaloidy			
Kapsaicinoidy (vanillylamidy)	<ul style="list-style-type: none"> • leucin, fenylalanin, valin, malonyl - CoA 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy paprik 	<ul style="list-style-type: none"> • kapsaicin, nordihydrokapsaicin, homodihydrokapsaicin
Pseudoalkaloidy			
Purinové alkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • puriny 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy kávy, čaje a kaka 	<ul style="list-style-type: none"> • kofein, theobromin
Steroidní (terpenoidní) glykoalkaloidy	<ul style="list-style-type: none"> • kyselina mevalonová 	<ul style="list-style-type: none"> • alkaloidy brambor a rajčat 	<ul style="list-style-type: none"> • solanin, tomatin

3.2.2.1. PRAVÉ ALKALOIDY

Pravé alkaloidy jsou N – heterocyklické báze, které jsou odvozené ze stejných prekurzorů (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.1.1. PYRIDINOVÉ, PIPERIDINOVÉ A PYRROLIDINOVÉ ALKALOIDY

Nejvýznamnějšími alkaloidy této skupiny jsou z hlediska lidské spotřeby především alkaloidy tabáku a pepře.

Nejnámějším alkaloidem tabáku (*Nicotiana tabacum* a *Nicotiana rustica*) je nikotin. Tato látka je používána k ovlivnění organoleptických vlastností cigaretového kouře a její obsah je ukazatelem kvality tabáku. Nikotin v rostlině tabáku představuje 0,3 – 5 % hmotnosti sušiny a je vždy doprovázen nornikotinem, anatabinem, anabasinem a dalšími strukturně příbuznými vedlejšími alkaloidy. Z celkových alkaloidů tabáku je však 95 % tvořeno nikotinem.

U skupiny pepřovníkovitých rostlin (*Piperaceae*), jako např. u pepře černého (*Piper nigrum*) se vyskytuje alkaloid zvaný piperin. Jeho obsah v bílém či černém pepři se pohybuje v rozmezí 30 – 80 g.kg⁻¹ (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.1.2. PYRROLYZIDINOVÉ ALKALOIDY

V této skupině se nachází více než 250 sloučenin, z nichž je okolo 50 % považováno za toxické. Vyskytují se u více než deseti čeledí, přičemž nejdůležitější z nich jsou čeledi bobovité (*Fabaceae*), brutnákovité (*Boraginaceae*) a hvězdnicovité (*Asteraceae*) (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.1.3. CHINOLIZIDINOVÉ ALKALOIDY

Tuto skupinu tvoří bicyklické, tricyklické a tetracyklické sekundární metabolity, které nacházíme v některých leguminosách rostlinné čeledě *Fabaceae*. Typické jsou například pro lupiny (*Lupinus*) a jelikož vysoké koncentrace těchto alkaloidů jsou toxické, mohou způsobovat problémy zejména u hospodářských zvířat při zkrmování. Z tohoto důvodu byly vyšlechtěny odrůdy lupin, které obsahují nízké procento alkaloidů (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.1.4. CHINOLINOVÉ ALKALOIDY

Tyto alkaloidy jsou také nazývány terpenoidní indolové alkaloidy a je jich známo více než 3000. Jsou obsaženy v rostlinách čeledí toješťovité (*Apocynaceae*), kulčibovité

(*Loganiaceae*) či mořenovité (*Rubiaceae*). Některé alkaloidy z této skupiny jsou používány pro medicínské účely (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.2. PROTOALKALOIDY

Protoalkaloidy jsou nearomatické aminosloučeniny odvozené od aminokyselin (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.2.1. KAPSAICINOIDY

Tyto látky se nacházejí u rostlin rodu *Capsicum* (paprika) z čeledi *Solanaceae* (lilkovité). Ostrost známá u plodů těchto rostlin je způsobena akumulací protoalkaloidu kapsaicin a jemu příbuzných látek, které se souhrnně nazývají kapsaicinoidy. Tyto sloučeniny jsou si strukturně velmi podobné, liší se pouze délkou navázaného uhlovodíkového řetězce a tím, zda je či není v tomto řetězci přítomna dvojná vazba (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.3. PSEUDOALKALOIDY

Pseudoalkaloidy jsou N – heterocyklické báze derivované z jiných prekurzorů (např. terpenoidů nebo purinů) (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.3.1. PURINOVÉ ALKALOIDY

Purinové alkaloidy jsou deriváty xantinu, který vzniká oxidací purinu. Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou kofein a theobromin.

Kofein se nachází v zrnech, listech a plodech více než 60 rostlin a vyskytuje se zde ve směsi s ostatními purinovými alkaloidy. Nejvýznamnějším zdrojem kofeinu jsou kávová zrna druhu *Coffea arabica*. Zelená nezralá zrna obsahují 0,53 – 1,45 % kofeinu v sušině.

Theobromin je hlavním alkaloidem kakaových bobů (*Theobroma cacao*). Tyto boby obsahují 0,6 – 3,1 % theobrominu v sušině (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.2.2.3.2. STEROIDNÍ GLYKOALKALOIDY

Tyto sloučeniny jsou zastoupeny převážně u čeledi lilkovité (*Solanaceae*), avšak můžeme je nalézt také u čeledí liliovitě (*Liliaceae*) či klejchovitě (*Asclepiadaceae*).

Steroidní glykoalkaloidy jsou v podstatě dusíkaté analogy steroidních saponinů. Jejich stavba je založena na C₂₇ cholestanové struktuře.

Tyto látky jsou produkovány za účelem ochrany rostliny proti hmyzu, chorobám a predátorům.

V bramborách (*Solanum tuberosum*) jsou přítomny dva hlavní glykoalkaloidy, α – chaconin a α – solanin, které mají společný aglykon solanidin.

Hlavními alkaloidy rajčat (*Solanum lycopersicum*) jsou α – tomatin, který obsahuje aglykon tomatidin, a α – dehydrotomatidin, který obsahuje aglykon dehydrotomatidin.

V baklažánu (*Solanum melongena*) se vyskytují převážně glykoalkaloidy α – solamargin a α – solasonin, jejichž aglykonem je solasodin (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.3. GLYKOALKALOIDY BRAMBOR

Friedman (2004) popisuje glykoalkaloidy jako přirozeně se vyskytující rostlinné steroidy, které obsahují dusík a uhlovodíkový postranní řetězec navázaný na 3 – OH pozici, což doplňuje definici publikovanou Smithem et al. (1996). Tato definice říká, že jde o látky, které se skládají z nepolárního lipofilního jádra tvořeného dvěma spojenými heterocyklickými cykly obsahujícími dusík, které je připojeno k polárnímu ve vodě rozpustnému trisacharidu. Seznam nejvýznamnějších alkaloidů shrnul Zrůst (2004a) v Tab. 2.

Tab. 2.: Nejvýznamnější SGA izolované z listů nebo hlíz druhů *Solanum* (Zrůst 2004a).

Glykosid	Aglykon	Sacharidická část	Struktura
α -solanin	solanidin	solatriosa	A: R-Gal <Rham/Glu
β -solanin	solanidin	solabiosa	B: R-Gal-Glu
γ -solanin	solanidin	galaktosa	C: R-Gal
α -chaconin	solanidin	chacotriosa	D: R-Glu <Rham-a/Rham-b
β_1 -chaconin	solanidin	chacobiosa	E: R-Glu-Rham-a
β_2 -chaconin	solanidin	chacobiosa	F: R-Glu-Rham-b
γ -chaconin	solanidin	glukosa	G: R-Glu
dehydrocommersonin	solanidin	commertetraosa	H: R-Gal-Glu <Glu/Glu
demissin	demissidin	lycotetraosa	I: R-Gal-Glu <Glu/Xyl
commersonin	demissidin	commertetraosa	jako H
solasonin	solasodin	solatriosa	jako A
α -tomatin	tomatidin	lycotetraosa	jako I

R = aglykon; Gal = galaktosa; Glu = glukosa; Rham = rhamnosa; Xyl = xylosa

Symbol "<" v charakteristice struktury sacharidické části znamená, že na substituovaný sacharid se váží dva další sacharidy (oddělené "/").

Zrůst (2004a) ve své práci rovněž uvádí, že SGA brambor jsou složeny ze tří základních strukturních složek. Těmito složkami jsou:

- polární hydrofilní sacharidická část
- nepolární lipofilní steroidní část
- heterocyklická dusíkatá bazická část.

Alkaloidy brambor jsou mnohdy hromadně označovány jako solanin. Tento název je však pouze orientační, jelikož se ve skutečnosti jedná o skupinu látek, které jsou si vzájemně

příbuzné svým aglykonem, který Kodíček (2004) popisuje jako necukernou složku glykosidů vázanou na cukernou složku glykosidovou vazbou a Friedman (2004) jako steroidní část glykoalkaloidu, která postrádá postranní uhlovodíkový řetězec. Zrůst (1999) publikoval, že tento aglykon se u steroidních glykoalkaloidů nalezených v hlízách kulturních brambor (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) nazývá solanidin (solanin – 5 α - 3 β - ol). Od tohoto aglykonu jsou odvozeny například glykoalkaloidy solanin a chaconin. Distl a Wink (2009) dodávají, že v jiných částech rostliny mohou být nalezeny i jiné glykoalkaloidy s jinými aglykony, jako např. v listech solasonin (odvozen od aglykonu solasodin) či solamargin (odvozen od téhož aglykonu).

Pokud se jedná o plané druhy rodu *Solanum* nebo jejich křížence s kulturními odrůdami, vyskytuje se v nich řada dalších glykoalkaloidů a tedy i aglykonů, na jejichž určování byly zaměřeny mnohé studie (Laurila et al., 1996; Distl a Wink, 2009). Griffiths et al. (2000) publikovali, že aglykony nalezené a identifikované u planých druhů *Solanum* jsou solasodin, tomatidenol, demissidin a tomatidin. Zrůst (2004a) doplnil tyto čtyři o acetylleptinidin a leptinidin.

Bylo také zjištěno, že při křížení kulturních odrůd *Solanum tuberosum* s planými druhy rodu *Solanum*, které probíhá například z důvodu zvýšení rezistence potomků vůči patogenům, může v nově vzniklých rostlinách dojít k expresi glykoalkaloidů, které se nevyskytovaly u ani jednoho z rodičů (Laurila et al., 1996; Distl a Wink, 2009).

Nejvýznamnějšími glykoalkaloidy bramborových hlíz jsou α - solanin a α - chaconin, které tvoří přibližně 95 % TGA (Smith et al., 1996; Zrůst, 1997; 2004b; Tömösközi – Farkas et al., 2006; Haase, 2010), nicméně toto číslo je pouze orientační, jelikož kupříkladu Coria et al. (2011) naměřili, že α - solanin a α - chaconin představovaly v jejich pokusech 89 % z TGA. Složení α - solaninu a α - chaconinu je patrné z Obr. I. v samostatných přílohách. Tyto sloučeniny však existují také v jiných než α - formách, přičemž tyto formy se liší množstvím navázaných cukerných molekul, jak naznačil Kvasnička (1998) v Tab. 3. Grafické znázornění struktury těchto forem solaninu a chaconinu je na Obr. II. v samostatných přílohách (Friedman, 2004).

Tab. 3.: Struktura forem solaninu a chaconinu u kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L. (Kvasnička, 1998).

Sloučenina	Struktura
α -solanin	soladinin + galaktosa + glukosa + rhamnosa
β_1 -solanin	soladinin + galaktosa + glukosa
β_2 -solanin	soladinin + galaktosa + rhamnosa
γ -solanin	soladinin + galaktosa
α -chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa (1) + rhamnosa (2)
β_1 -chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa (2)
β_2 -chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa (1)
γ -chaconin	soladinin + glukosa

3.3.1. HODNOCENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ V HLÍZÁCH

Při hodnocení obsahu GA je nutné otestovat dostatečně velké množství hlíz, aby se předešlo případným chybám ve výsledcích z důvodu nízké reprezentativnosti vzorku. Kvasnička (1998) uvádí, že by se mělo odebírat minimálně 15 hlíz. Pro následné hodnocení hladin GA v nich se používají různé systémy, které jsou uvedeny dále.

V České republice platí legislativní limit pro obsah glykoalkaloidů v hlízách kulturních odrůd brambor, který nesmí být překročen z důvodu zdravotní nezávadnosti hlíz určených ke konzumaci. Tento limit je 200 mg celkových glykoalkaloidů na kg čerstvých hlíz (Vyhláška č. 305/2004 Sb. ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách).

Zrůst (1999) navrhnul devítibodovou stupnici pro hodnocení obsahu glykoalkaloidů v hlízách se slupkou. Tato stupnice je znázorněna v Tab. 4. Autor uvádí, že odrůdy ohodnocené jedním bodem by se neměly pěstovat, a kvůli kolísání GA v hlízách nedoporučuje ani pěstování odrůd ohodnocených třemi body pro konzumní účely.

Tab. 4.: Rozmezí obsahu glykoalkaloidů (Zrůst, 1999).

Obsah GA	v mg.kg ⁻¹ *	Body
Velmi nízký	< 50	9
Nízký	50 – 79	7
Střední	80 – 159	5
Vysoký	160 – 200	3
Velmi vysoký	> 200	1

* syrových hlíz se slupkou

3.3.2. VLASTNOSTI GLYKOALKALOIDŮ

3.3.2.1. TOXICITA

Běžně uznávaným faktem je, že glykoalkaloidy jsou toxické látky. Jsou toxické pro zvířata i člověka. Bylo zjištěno, že u myší způsobují abnormální zvětšování jater/hepatomegalii (Friedman et al., 2003) či u žab deformace a úhyny (Rayburn et al., 1995). U člověka způsobují širokou škálu příznaků, mezi které patří poruchy zažívacího traktu (bolesti břicha, zvracení, průjem), zmatenost, halucinace, částečná paralýza, křeče, koma a dokonce i smrt (Smith et al., 1996). Dle Zrůsta (1999) je jejich toxicita způsobena dvěma faktory. Prvním z nich je, že působí na centrální nervový systém tím, že inhibují enzym cholinesterázu, který, jak publikovali Smith et al. (1996), je zodpovědný za hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu. Druhým faktorem odpovědným za toxicitu GA je dle Zrůsta (1999) to, že poškozují strukturu buněčných membrán a tím i trávicí trakt a další tkáně. V důsledku poškození membrán nastává hemolýza a krvácení a také se zvyšuje permeabilita těchto membrán, pokud se dosáhne určité koncentrace alkaloidů. Zvýšením této propustnosti stěn nastává větší vstřebávání alkaloidů střešní stěnou, a proto je pravděpodobně tak malý rozdíl mezi smrtelnou a běžně přijímanou dávkou (Zrůst, 1999).

Friedman et al. (2003) uvádějí, že α – chaconin je toxičtější než α – solanin, ale v určitých poměrech mohou reagovat synergisticky.

Odhadovaná nejvyšší hladina TGA, která je zdravotně nezávadná pro lidskou konzumaci, je okolo 1 mg.kg⁻¹ tělesné váhy, toxická dávka se pohybuje okolo 1,75 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti a smrtelná dávka představuje přibližně 3 – 6 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti (Friedman et al., 2003).

3.3.2.2. POZITIVNÍ VLASTNOSTI

V kontrastu k těmto negativům zjistili Lu et al. (2010) inhibiční účinek α - solaninu na lidské melanomové buňky *in vitro*. Buňky tohoto typu rakovinového onemocnění byly v rámci této studie vystavovány různým koncentracím α - solaninu a byl sledován vliv těchto množství na jejich viabilitu, migraci a schopnost pronikání extracelulární matrix. Výsledky ukázaly, že koncentrace α - solaninu ve výši 23 μ M způsobila značný pokles viability nádorových buněk, což svědčí o cytotoxickém působení α - solaninu na tyto buňky. Ovšem koncentrace pod 18,4 μ M viabilitu buněk výrazně neovlivnila, což vypovídá o tom, že takovéto množství α - solaninu již cytotoxický efekt nemá. Obdobné výsledky vyšly i při vystavování normálních lidských buněk (keratinocytů a fibroblastů) těmto koncentracím, což

ukazuje, že množství 18,4 μM α - solaninu není cytotoxické. Autoři uvádějí, že tyto výsledky naznačují závěr, že inhibice melanomových buněk není způsobena cytotoxickým působením α - solaninu na tyto buňky. Při sledování vlivu α - solaninu na migraci melanomových buněk bylo prokázáno snížení této migrace o 18,9 % při koncentraci α - solaninu 9,2 μM , o 35,6 % při koncentraci α - solaninu 13,8 μM a o 38,8% při koncentraci α - solaninu 18,4 μM . Schopnost průniku melanomových buněk skrz extracelulární matrix byla po vystavení těchto buněk α - solaninu také snížena. Opět byly použity koncentrace α - solaninu 9,2, 13,8 a 18,4 μM a pozorované snížení bylo o 52,5, 80,2 a 94,3 %. Lu et al. (2010) vidí v těchto nálezech nový terapeutický potenciál alfa- solaninu v antimetastázové terapii.

Běžně uváděnou informací také je, že při běžných koncentracích (20 – 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvých hlíz) se GA podílejí na tvorbě typické chuti a vůně brambor (Zrůst, 1999).

3.3.2.3. Vliv glykoalkaloidů na rostlinu

Glykoalkaloidy pravděpodobně napomáhají rezistenci brambor vůči mnohým patogenům. Výsledky podporující tuto teorii publikovali Tömösközi – Farkas et al. (2006), kteří sledovali obsahy GA v odrůdách brambor, jež vykazaly značnou rezistenci vůči patogenům. Tyto obsahy byly porovnávány s těmi, které byly naměřeny u odrůd s nízkou rezistencí. Obsahy GA u rezistentních odrůd značně převýšily obsahy u odrůd snadno podléhajících patogenům. Smith et al. (2001) potvrdili předpoklad, že glykoalkaloidy mají odpuzovací schopnost proti škůdcům, jelikož ve své studii prováděné na hlemýždi *Helix aspersa* L. zjistili, že při podání potravy napuštěné GA se snižuje krmivá aktivita hlemýžďů.

Nicméně GA mohou mít i jiné účinky, jako například ovlivnění intenzity růstu rostlin. Tento jev zkoumali Coria et al. (2011), kteří ve svém pokusu přidali exogenní glykoalkaloidy (α -solanin, α -chaconin a aglykon solanidin) v různých koncentracích do média, na kterém poté rostly při pokojové teplotě 21 °C bramborové explantáty. Množství GA dodávaná do médií byla 0, 10, 25, 50 nebo 100 μM a vzájemný poměr GA byl 45 : 45 : 10 pro α - solanin, α - chaconin a solanidin, jelikož bylo předem zjištěno, že právě v tomto poměru se tyto látky v rostlinách nejčastěji nacházely. Výsledky jasně prokázaly, že exogenní glykoalkaloidy v médiích výrazně snižovaly schopnost růstu semenáčků, jak dokládá Obr. 1. Byl zjištěn jasný negativní vliv GA na prodlužovací růst stonků v závislosti na koncentraci GA v médiu. Při 10 μM došlo omezení prodlužování stonku o 48 % po 45 dnech inkubace ve vztahu ke kontrolám pěstovaným na médiích bez přídavku GA. Při 50 μM GA v médiu bylo dále inhibováno prodlužování a také došlo k chlorózám či inhibici růstu kořenů. 100 μM způsobilo úplnou inhibici vývoje semenáčků.

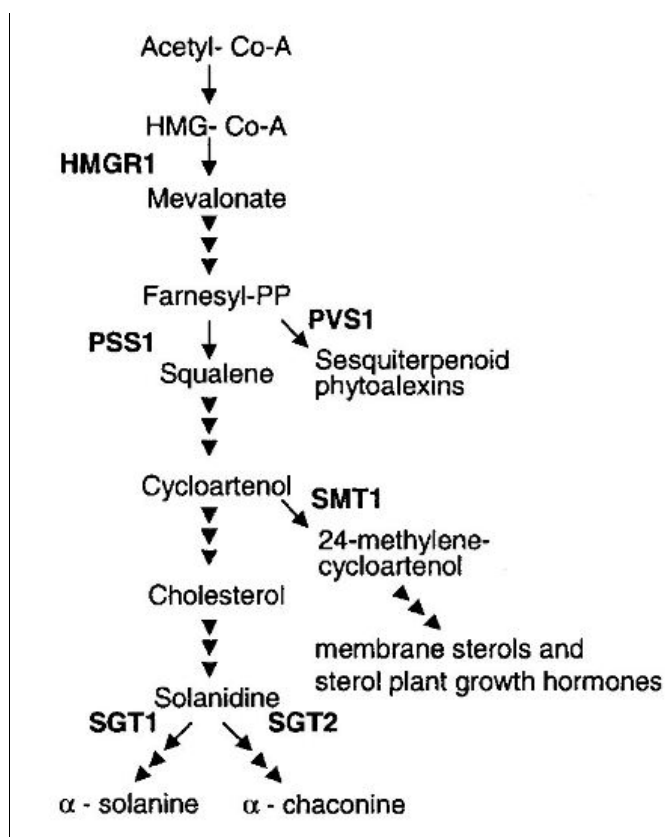
Obr. 1.: Bramborové sazenice *in vitro* po 45 dnech inkubace v médiu s přidanými GA. Zleva doprava: 0, 10, 25, 50 nebo 100 mikromolů celkové koncentrace alkaloidů v poměru 45 : 45 : 10 pro α – solanin, α – chaconin a solanidin. Sazenice byly umístěny v 21 °C. (Coria et al., 2011)



3.3.3. BIOSYNTÉZA A DEGRADACE GLYKOALKALOIDŮ

Jak uvádí Krits et al. (2007), je známo jen několik detailů o procesu biosyntézy a o faktorech, které regulují intenzitu tvorby steroidních glykoalkaloidů (SGA). Biosyntéza SGA probíhá přes tzv. mevalonátovou/isoprenoidní dráhu. První krok isoprenoidní syntézy katalyzuje enzym 3 – hydroxy – 3 – methylglutarylkoenzymAreduktáza (HMGR). Později enzymy skvalensyntáza (PSS1) a vetispiradien(sesquiterpen)cycláza (PVS1) katalyzují první kroky větvení biosyntetické dráhy. Vzniklé větve vedou ke sterolům a následně k SGA (větvev vzniklá působením enzymu PSS1) či k seskviterpenoidním fytoalexinům (větvev vzniklá působením enzymu PVS1). Předpokládá se, že v dalších krocích isoprenoidní biosyntetické dráhy je solanidin (prekurzor α - chaconinu a α - solaninu) syntetizován z cykloartenolu přes cholesterol. V závěru biosyntézy SGA probíhá glykosylace solanidinu enzymy solanidinglukosyltransferáza (SGT2) a solanidingalaktosyltransferáza (SGT1). SGT1 vede k tvorbě α – solaninu a SGT2 k tvorbě α – chaconinu. Tento proces je znázorněn na Obr. 2.

Obr. 2.: Schematické znázornění předpokládaného průběhu biosyntézy SGA. Trojité šipky znázorňují několik enzymatických kroků (Krits et al., 2007).



Co se týče degradace glykoalkaloidů, byla provedena studie týkající se rozkladu těchto látek v podzemní vodě. Tuto studii provedli Jensen et al. (2009), protože glykoalkaloidy se často dostávají do půdy pomocí vegetativních částí rostlin či brambor zanechaných v půdě po sklizni. Jelikož brambory jsou často pěstovány v oblastech s písčitymi půdami a vysokými úhrny srážek, je zde riziko kontaminace podzemní vody. Proto byla sledována rychlost degradace α – solaninu, α – chaconinu a produktů jejich rozkladu ve vodě získané z hloubky 3 m pod povrchem písčité půdy, ve které byly pěstovány brambory. Výsledky ukázaly, že α – solanin byl kompletně degradován během 21 dní a α – chaconin během 42 dní. Tato degradace byla pravděpodobně způsobena aktivitou mikroorganismů nacházejících se v podzemní vodě, přičemž nejprve proběhl rozklad uhlovodíkových částí a až později aglykonu solanidinu.

3.3.4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH GLYKOALKALOIDŮ

Na obsah glykoalkaloidů má vliv mnoho různých faktorů, mezi nimiž můžeme jmenovat např. to, v jaké části rostliny se nachází. Dále tento obsah ovlivňují podmínky působící během růstu dané rostliny (pěstební podmínky), mezi které se řadí klimatické

podmínky (ročník), výživa rostlin, zralost rostliny při sklizni či odrůda, kterou pěstujeme. Obsah GA je ovlivněn také mechanickým poškozením a skladovacími podmínkami (osvětlení, teplota skladování).

Zrůst (2004a) uvádí, že faktory působící na hlízy mohou ovlivnit obsah GA až o 60 %.

3.3.4.1. VLIV ROZMÍSTĚNÍ GLYKOALKALOIDŮ V ROSTLINĚ

Zrůst (1999) popisuje, že glykoalkaloidy byly nalezeny prakticky ve všech částech bramboru, konkrétně se jedná o listy, stonky, květy, bobule, hlízy a klíčky. Rozdílné jsou ovšem jejich koncentrace v těchto konkrétních částech. GA jsou zastoupeny nejvíce v zónách zvýšené metabolické aktivity (Zrůst, 1999), jak uvádí Smith et al. (1996) v Tab. 5. Nicméně rozdíly se vyskytují i mezi jednotlivými hlízami, stonky či listy jedné rostliny a také ve stejné hlíze nebo květu (Zrůst, 1999).

Co se týče samotné hlízy, nacházejí se GA především v blízkosti slupky, nejvíce ve vrstvě 1,5 mm pod povrchem (Smith et al., 1996). Tuto informaci publikovali také Tömösközi – Farkas et al. (2006), kteří nicméně doplnili, že u zelených či klíčících hlíz je obsah GA vysoký také ve vnitřních částech hlízy.

Smith et al. (1996) v Tab. 5. naznačili, jaké jsou přibližné hladiny GA v různých částech rostliny bramboru a hlízy.

Tab. 5.: Hladiny glykoalkaloidů v různých částech rostliny bramboru (Smith et al., 1996 – upraveno).

Část rostliny	Koncentrace GA (mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti)
Květy	2150 – 5000
Listy	230 – 1000
Stonky	23 - 33
Kořeny	180 - 400
Hořce chutnající hlízy	250 - 800
Celé hlízy	10 - 150
Pokožka (2 – 3 % z hlízy)	300 - 640
Slupka (10 – 12 % z hlízy)	150 - 1068
Dužnina	12 - 100
Klíčky	2000 - 7300

3.3.4.2. VLIV PĚSTEBNÍCH PODMÍNEK

Klimatické podmínky, ve kterých probíhá růst a vývoj rostlin, jsou zásadní pro obsah glykoalkaloidů v těchto rostlinách. Lze říci, že vliv těchto podmínek (tedy vliv ročníku) vykazuje z pěstebních podmínek jeden z nejdůležitějších efektů, jak dokládá mnoho studií zaměřených na tento problém (Zrůst, 1997; Přichystalová – Fialková et al., 1999). Například Zrůst (1997) publikoval výsledky, ze kterých vyplývá, že ze sledovaných let byl obsah glykoalkaloidů velmi vysoký v roce, ve kterém byly brambory podrobeny velkému srážkovému deficitu a tedy stresu způsobenému suchem. Samotný stres ze sucha ale nepůsobil jednoznačně, naměřené výsledky byly v interakci s reakcemi odrůd.

Vliv odrůdy je proto rovněž velmi důležitý, což také dokládá Zrůst (1997) a dodává, že obsah GA v hlízách je geneticky fixován, a proto musí šlechtitelé dbát na výběr rodičovských párů pro šlechtění. Přichystalová – Fialková et al. (1999) rovněž zjistili statisticky významné rozdíly mezi odrůdami, ovšem v každém pokusném roce bylo pořadí odrůd z hlediska obsahu GA rozdílné. Nicméně průměry z více let se u odrůd k sobě blížily.

Přichystalová – Fialková et al. (1999) ve své studii také vysledovali, že vliv stanoviště měl na obsah GA větší vliv než vliv ročníku. V této studii byly založeny polní pokusy na dvou stanovištích, v Žabčicích u Brna a ve Valečově u Havlíčkova Brodu. Obsah GA vždy převažoval na stanovišti Valečov.

Dalším významným faktorem ovlivňujícím biosyntézu GA je úroveň výživy rostlin. Zrůst (1997) uvádí, že z pokusů zaměřených na vliv dodávaných dávek živin na obsah GA vyplynulo, že zvýšení dávky dusíku a případně i fosforu či draslíku způsobuje nárůst celkových GA v hlízách, přičemž při porovnání výrazně odlišných dávek živin jde o průkazné rozdíly. Z těchto pokusů také vyplynulo, že nejvýraznější vliv má zvyšování obsahu dusíku, které kladně ovlivňuje obsah α – chaconinu i α – solaninu. Tato zjištění proto varují před aplikací vysokých dávek dusíku k bramborům. Podobný trend zaznamenali i Přichystalová – Fialková et al. (1999).

Högy a Fangmeier (2009) sledovali ve své studii vliv obohacení atmosféry přidávkem CO₂ během růstu brambor na různé vlastnosti hlíz. V rámci této studie bylo prokázáno, že CO₂ v ovzduší má negativní vliv na obsah GA v hlízách. Významné negativní vztahy byly zjištěny mezi koncentracemi CO₂ a α – chaconinu (při nárůstu koncentrace CO₂ v ovzduší z 380 na 550 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ se snížil obsah α – chaconinu o 12,6 %) a také u celkových glykoalkaloidů (při nárůstu koncentrace CO₂ v ovzduší z 380 na 550 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ se snížil obsah TGA o 10,8 %). Oproti tomu koncentrace α – solaninu nebyla tak

výrazně ovlivněna úrovní CO₂ (při nárůstu koncentrace CO₂ v ovzduší z 380 na 550 μmol.mol⁻¹ se snížil obsah α - solaninu o 6,5 %).

Naopak nebyl prokázán vliv užívání chemických přípravků sloužících k ochraně proti plevelům a plísní bramborové na obsah GA, proto není třeba se obávat jejich použití (Zrůst, 1997).

3.3.4.3. VLIV SKLADOVACÍCH PODMÍNEK

Je zřejmé, že délka skladování má na obsah glykoalkaloidů vliv. Zrůst (1997) publikoval, že při skladování se u tří sledovaných odrůd brambor obsah GA v prvních pěti měsících zvyšoval a v dalších třech měsících naopak klesal a to až téměř na počáteční hodnoty. Naměřené rozdíly v hodnotách obsahu GA však nebyly průkazné a autor uvádí, že prvotní nárůst GA mohl být způsoben vyššími teplotami ve skladu na počátku skladování, které byly udržovány záměrně z důvodu tzv. hojivého období brambor.

Na obsah GA má vliv i teplota skladování v kombinaci s klíčením hlíz, jak prokázal ve svém experimentu Haase (2010). V tomto pokusu byly brambory poté, co prošly 3 týdny trvajícím hojivým obdobím při 15 °C, vystaveny teplotám 10 °C, 8 °C a 4 °C. Skladování při teplotě 4 °C, které bylo dosaženo pozvolným ochlazováním za účelem omezení stresování hlíz prudkým poklesem teploty, nijak výrazně neovlivnilo koncentraci GA, ale při 10 °C došlo k zvýšení této koncentrace. Klíčení také vyvolalo změny v obsahu GA. Pokud byly použity inhibitory klíčení, nenastaly změny v obsahu GA, a to ani při teplotě 8 °C. Z těchto výsledků je patrné, že je nutné věnovat způsobu uskladnění brambor velkou pozornost. Vliv teploty na obsah GA zjistili již dříve i Rosenfeld et al. (1995), kteří zaznamenali téměř dvojnásobný obsah GA u vzorků hlíz skladovaných při 23 °C oproti vzorkům uskladněným při 5 °C.

Dalším faktorem, kterým je obsah GA v hlízách ovlivňován, je světlo. Vliv osvětlení sledovali Rosenfeld et al. (1995) v pokusu, ve kterém byly hlízy uskladněny v obalových materiálech s různou propustností světla. Obaly, které byly transparentní, byly různě barevné pro zjištění vlivu světla o různých vlnových délkách. V hlízách uskladněných v obalech, které světlo nepropouštěly, byl obsah TGA nejnižší ze sledovaných. Naopak u transparentních obalů byl naměřen obsah TGA nejvyšší, a to konkrétně u modrých (vlnová délka 430 nm), které byly následovány červenými (650 nm). Autoři výsledky shrnují tak, že brambory by se měly skladovat při 5 – 6 °C a měly by být vyloučeny transparentní obaly, aby se zabránilo nárůstu obsahu TGA.

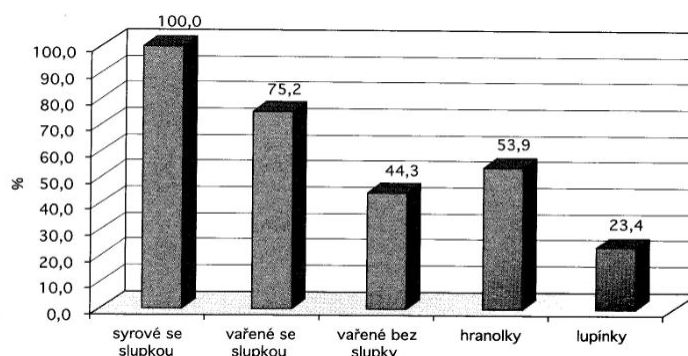
3.3.4.4. VLIV MECHANICKÉHO POŠKOZENÍ

Mnoho studií dokládá, že mechanické poškození hlíz má velký vliv na obsah glykoalkaloidů v nich. Zrůst (1997) provedl experiment, ve kterém byly hlízy vystaveny 19 pádům z výšky 1 m na ocelové pruty bubnu, který byl zhotoven speciálně pro tyto účely. Hlízy byly během tohoto procesu poraněny do hloubky 2 – 3 mm a místy byla sedřená slupka. Poté byl sledován obsah glykoalkaloidů, který byl porovnáván s hodnotami naměřenými u nepoškozených brambor. Došlo k nárůstu o 136,8 – 164,5 %, přičemž obsah α – chaconinu se zvyšoval více než obsah α – solaninu.

3.3.4.5. VLIV KULINÁRNÍCH ÚPRAV

Zrůst et al. (2003) provedli pokus, ve kterém u 31 českých a 3 slovenských odrůd měřili obsah glykoalkaloidů v syrových hlízách se slupkou, v hlízách vařených ve slupce i bez slupky, v hranolcích a lupíncích. Poté byly naměřené hodnoty upravených hlíz porovnávány se syrovými hlízami se slupkou. Výsledky ukázaly, že hlízy vařené ve slupce měly o 24,8 % nižší obsah GA oproti syrovým hlízám se slupkou, což bylo pravděpodobně způsobeno vyluhováním glykoalkaloidů, které jsou rozpustné ve vodě, do varné lázně. U vařených hlíz bez slupky došlo k průměrnému snížení obsahu GA o 55,7 %, což bylo s nejvyšší pravděpodobností způsobeno jednak předpokládaným silnějším vyluhováním těchto látek do vody, ale hlavně samotným odstraněním slupky, která obsahuje vyšší hladiny GA než zbylé části hlízy. U hranolků bylo pozorováno snížení obsahu GA o 46,1 %, na což mělo vliv taktéž oloupání slupky, dále vyluhování GA z dělených hlíz do oplachových vod, proces blanšírování po nakrájení hlíz na hranolky a také vlastní smažení, při kterém dochází opět k vyplavování GA. K nejvýraznějšímu poklesu hladiny GA došlo u lupínků, konkrétně o 76,6 %. Zde se skloubilo oloupání hlíz s proplavováním lupínků a také smažením. Všechny tyto výsledky jsou názorně zobrazeny na Grafu 1.

Graf 1.: Vliv zpracování syrových hlíz se slupkou na obsah TGA (α – chaconinu + α – solaninu).



3.4. METODY STANOVENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ

Zrůst (2004) dělí metody stanovení GA u brambor na dvě skupiny. Jsou to:

- a) metody stanovení TGA
- b) metody stanovení individuálních glykoalkaloidů

Autor také uvádí, že mezi metody stanovení TGA patří gravimetrie, titrace či spektrofotometrie. Metody stanovení individuálních glykoalkaloidů jsou pak chromatografie, elektroforéza, hmotnostní spektrometrie nebo ELISA.

Nejčastěji využívaná metoda pro stanovování obsahu glykoalkaloidů v bramborách je pravděpodobně metoda HPLC (Zrůst, 2004; Tömösközi – Farkas et al., 2006). Zrůst (2004) také dodává, že tato metoda je nejvýhodnější i z hlediska nároků na přípravu vzorků. Metoda HPLC patří mezi chromatografické metody. Tömösközi – Farkas et al. (2006) publikovali, že k chromatografickým metodám se dále řadí plynová chromatografie (GC) či tenkovrstevná chromatografie (TLC). Tyto metody mají dle Sýkorové et al. (2008) všechny obdobný průběh. Proces je zahájen startem, tedy nástřikem či nanášením vzorku. Poté sledovaný vzorek přechází do stacionární fáze (např. chromatografická kolona), kde dochází k oddělování analytů za působení mobilní fáze. Ta unáší analyty k detektoru či vyhodnocovacímu zařízení, které jsou na konci systému. Tam se měří čas nebo vzdálenost, které sledovaná sloučenina musela překonat. Na závěr se identifikuje sloučenina a vyhodnotí výstup, kterým je zpravidla chromatogram (na ose x je čas a na ose y odezvy signálu).

3.4.1. HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie)

Sýkorová et al. (2008) popisují, že metoda HPLC, tedy kapalinová chromatografie, je založena na separaci látek unášených mobilní fází (kapalinou, eluentem) kolonou, která je naplněna stacionární fází (sorbentem), na základě rozdílné afinity a distribuce mezi obě fáze,

přičemž separace je založena na rozdílné adsorpci látek na stacionární fázi. Zrůst (2004) uvádí, že pro separaci glykoalkaloidů lze využít rozsáhlé spektrum chromatografických systémů, nicméně nejčastěji podle něj bývá pro separaci použita kolona (stacionární fáze) naplněná silikagelem s vázanými C₁₈ skupinami (principem separace je potom různá hydrofobicita glykoalkaloidů) nebo s vázanými aminopropylovými (Si-NH₂) skupinami (separace je založena na rozdílné interakci sacharidické části molekuly glykoalkaloidu se sorbentem). Jako mobilní fáze bývá dle autora často použita například směs acetonitrilu s vodou.

Co se týče detektorů, Zrůst (2004) publikoval, že nejrozšířenější je UV detekce ($\lambda < 215$ nm), avšak Sýkorová et al. (2008) doplnili, že v dnešní době se velmi využívají hmotnostně spektrometrické detektory.

3.4.2. GC (plynová chromatografie)

Tato metoda může být použita pro kvalitativní i kvantitativní stanovení jak glykosidů, tak i aglykonů (Zrůst, 2004).

Princip metody podle Sýkorové et al. (2008) spočívá v separaci látek v plynném stavu, které jsou unášeny inertním plynem kolonou, jež má určitou stacionární fázi. Tyto látky se distribuují mezi nosný plyn a stacionární fázi. Autorka dále uvádí, že analyty jsou do plynného stavu převedeny při teplotě 150 – 300 °C.

3.4.3. TLC (tenkovrstevná chromatografie)

Zrůst (2004) ve své práci zmínil, že tato metoda se pro kvantitativní analýzu GA používá nejdéle.

Pracuje se s tenkými vrstvami silikagelu a jako mobilní fáze bývají použity chloroform – metanol v poměru 19 : 1, chloroform – etanol – 1 % amoniak v poměru 2 : 2 : 2 a ethyl acetát – pyridin – voda v poměru 3 : 1 : 3 (Zrůst, 2004).

4. MATERIÁL A METODY

Tato práce vznikla pod záštitou rostlinné sekce Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze v rámci výzkumu zde probíhajícího, který se zaměřuje na studium brambor (rod *Solanum*).

4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

V rámci tohoto výzkumu byla v roce 2009 provedena somatická hybridizace mezi druhy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (2n klon DH165) a *Solanum bulbocastanum* (PI PI243510 klon PIS66), která byla primárně zaměřena na zjištění vlivu křížení kulturních a planých brambor na výskyt plísně bramborové (*Phytophthora infestans*). Jedinci vzniklí z této hybridizace byli v květnu 2010 přesazeni na pole náležící k pokusnému pozemku České zemědělské univerzity v Praze, který se nachází v Praze – Suchdol. Prostor vyhrazený pro pokus byl rozdělen do dvou bloků (I. a II. – toto značení se promítlo i v kódech vzorků hlíz), přičemž v každém bloku byla jedna či více rostlin od každého genotypu.

Rostliny byly pravidelně ošetřovány prostředkem proti mandelince bramborové Mospilan 20 SP (Sumi Agro Czech, s. r. o.) podle signalizace jejího zvýšeného výskytu. Také bylo pravidelně prováděno ruční odplevelování a provzdušňování řádků. Během vegetace nebylo prováděno přihnojování.

Sklizeň hlíz probíhala přibližně v polovině října (po 5 měsících) a byla provedena ručně, aby se co nejvíce omezilo riziko mechanického poškození hlíz. Pro potřeby dalších pokusů byly vybírány hlízy, které měly pokud možno vyrovnanou velikost v porovnání s ostatními regeneranty z důvodu snížení možnosti dosažení nepřesných výsledků. Nicméně některé rostliny nesly jen omezené množství hlíz konzumní velikosti, proto bylo nutné v několika případech použít vzorky rozdílných velikostí. Data později získaná z těchto vzorků jsou proto v části 5 této práce („Výsledky“) zřetelně označena (označení „A“). Vybrané vzorky hlíz byly po sklizení zlehka očištěny a ponechány, aby vydýchaly 14 dní při teplotě 15 °C z důvodu hojivého období brambor. Následně byly vloženy do polyethylenových uzavíratelných sáčků, které byly označeny kódem daného regenerantu, a uskladněny v temnu v chladničce při teplotě 4 °C. Takto zůstaly až do doby měření obsahu základních glykoalkaloidů (α – solaninu a α – chaconinu), které se uskutečnilo v průběhu dubna 2011, tedy přibližně 6 měsíců po sklizni.

4.2. EXTRAKCE GLYKOALKALOIDŮ A JEJICH STANOVENÍ

V rámci bakalářské práce bylo analyzováno 23 vzorků odebraných od 15 somatických hybridů. Seznam vzorků hodnocených genotypů je součástí Tab. 6. v části 5 („Výsledky“).

Všechna měření probíhala ve dvou opakováních (a, b), tedy od každého vzorku byly otestovány dvě hlízy. Pokud velikost či množství hlíz získaných od konkrétní rostliny neumožňovaly použít dvě hlízy, byly testy provedeny na jedné hlíze dvakrát. Takovéto případy jsou v části 5 této práce („Výsledky“) zřetelně označeny (označení „B“).

Pro účely měření byly hlízy nejprve očištěny a omyty, aby byly zbaveny hrubých nečistot (zbytky hlíny). Pokud se na některých nacházely klíčky, byly mechanicky odstraněny, jelikož by došlo ke zkreslení výsledků z důvodu velmi vysokého množství GA v těchto klíčcích. Omyté hlízy nebyly dále ani loupány ani jinak kuchyňsky upravovány, jelikož obsah glykoalkaloidů byl stanovován v syrových hlízách se slupkou. Pouze byly nakrájeny na kostky.

Část materiálu byla odebrána pro účely zjištění obsahu sušiny v daném vzorku. Tyto kostky byly nakrájeny na ještě drobnější, které byly vloženy do váženek a sušeny při 105 °C v horkovzdušné sušárně po dobu 24 hodin. Poté byl vypočítán procentuelní obsah sušiny z původní čerstvé hmotnosti.

Pro zjištění obsahu GA bylo naváženo zhruba 15 g vzorku. K těmto 15 g vzorků hlíz bylo přilito 60 ml metanolu a tato směs byla homogenizována kuchyňským ručním mixérem po dobu 1 min, aby došlo k extrakci látek z hlíz. Poté byl vzorek zfiltrován do 100 ml baňky a doplněn methanolem na celkový objem 100 ml extraktu. Takto připravený filtrát byl převeden přes 0,45 µm PVDF mikrofiltr do vialky.

Obsah glykoalkaloidů byl zjištěn metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC na přístroji s částmi chromatografického systému Ultimate 3000 RS (Dionex, USA) a hmotnostním detektorem 3200 QTRAP (AB Sciex, USA). Podmínky stanovení byly následující:

- Analytická kolona: Pinnacle DB C18 (50 × 2,1 mm; 1,9 µm)
- Mobilní fáze: ACN : MeOH : voda : 0,1 M octan amonný (200 : 100 : 550 : 50), pH=3,5 (kyselina mravenčí)
- Průtok: 0,4 ml.min⁻¹
- Nástřik: 1 µl
- Teplota kolony: 40 °C
- Doba analýzy: 10 min

- Detekce: ESI - MS/MS

Identifikace glykoalkaloidů ve vzorcích byla provedena pomocí porovnání kvantifikačního a konfirmačního přechodu a retenčního času vzorků a retenčního času standardů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou kalibrační přímky. Rozsah kalibrační přímky byl $0,05 - 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro α -chaconin i α -solanin.

4.3. STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Data získaná měřením obsahu GA metodou HPLC byla setříděna podle jednotlivých genotypů. U některých byly získány až 3 samostatné výsledky (každý ve dvou opakováních) z důvodu vyššího množství vysazených rostlin, nicméně vždy se jeden z těchto tří výsledků výrazněji lišil od zbylých dvou, proto byl odebrán z dalších statistických hodnocení. Je pravděpodobné, že tento lišící se vzorek mohl být zatížen chybou při měření, kterou mohlo být například vyšší množství slupek v měřeném materiálu.

Takto protříděné výsledky byly zprůměrovány v rámci konkrétního somatického hybrida (průměr z opakování) a následně v rámci celkového genotypu (průměr ze všech měřených a vytříděných hybridů získaných od daného genotypu). Tyto konečné hodnoty byly dále podrobeny statistickým analýzám, které byly provedeny pomocí programu STATISTICA 9 CZ. Pomocí tohoto programu byly také vygenerovány histogramy znázorňující pravděpodobnost normality rozdělení četností jednotlivých hodnot. Pro výpočet této normality rozdělení byl použit Shapiro – Wilkův test (SW). Pokud hustota pravděpodobnosti $p \geq 0,9500$, distribuce dat byla ohodnocena tak, že odpovídala normálnímu rozdělení. Počet sloupců (intervalů) v histogramech, tedy 8 sloupců, vyšel dle vztahu $2\sqrt{n}$, kde n je počet vzorků (15).

Pro hodnocení genotypů bylo poté využito dat získaných ze zprůměrovaných výsledků. Vše je uvedeno v části 5 („Výsledky“).

5. VÝSLEDKY

Obsah α – solaninu a α – chaconinu byl stanovován v mg.kg^{-1} jak čerstvé hmoty pro porovnání obsahu GA v hlízách s legislativním limitem 200 mg.kg^{-1} , tak i sušiny pro porovnání obsahů GA v jednotlivých genotypech mezi sebou, jelikož obsahy sušiny se u konkrétních regenerantů těchto genotypů lišily. TGA v čerstvých hlízách byly vyhodnoceny jakožto suma α – solaninu a α – chaconinu. Hrubá data získaná od 23 konkrétních somatických hybridů jsou znázorněna v Tab. 6.

Tato data byla dále zprůměrována, aby bylo možné přehledně zhodnotit jednotlivé genotypy, kterých bylo celkem 15, což znázorňuje Tab. 7. Pro obsahy α – solaninu, α – chaconinu, TGA v čerstvé hmotě a TGA v sušině byly vytvořeny histogramy znázorňující pravděpodobnost normality rozdělení četností jednotlivých hodnot.

Z těchto průměrů jednotlivých genotypů byl dále pro α – chaconin, α – solanin, TGA, sušinu a obsah TGA v sušině vypočítán celkový průměr všech genotypů, minimální a maximální hodnoty (MIN, MAX), variační rozpětí (R), směrodatná odchylka (s_x) a variační koeficient (v_k). Tyto výsledky jsou zaznamenány v Tab. 8.

Průměry jednotlivých genotypů byly dále zhodnoceny pomocí devítibodové stupnice, kterou navrhnul Zrůst (1999). Pro toto hodnocení byl vytvořen histogram znázorňující četnost výskytu hodnot spadajících do jednotlivých intervalů stupnice.

Četnosti výskytu hodnot v intervalech vypočítaných dle vzorce uvedeného v části 4.3. této práce („Statistické zhodnocení výsledků“) byly dohromady zaznamenány v grafickém souhrnu, jehož součástí je i seznam významných statistických výpočtů. Tento grafický souhrn je součástí samostatných příloh (Obr. III.).

Tab. 6.: Obsah α – chaconinu, α – solaninu, TGA v čerstvé hmotě a TGA v sušině v hlízách somatických hybridů brambor. Označení A v horním indexu u varianty opakování ve sloupci „Opakování“ značí, že tato hlíza byla výrazně menší než ostatní hlízy. Označení B v horním indexu kódu somatického hybridu ve sloupci „Somatický hybrid“ značí, že výsledky tohoto regenerantu byly získány z jedné hlízy. Ve sloupci „TGA v čerstvé hmotě [mg.kg⁻¹]“ jsou červeně označeny obsahy GA, které překročily legislativní limit 200 mg.kg⁻¹.

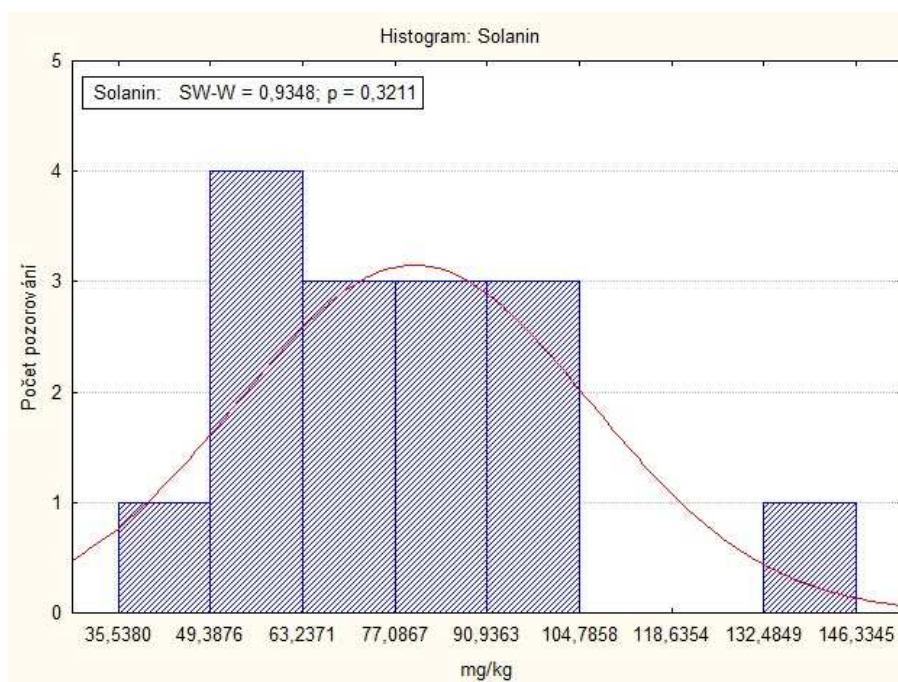
Somatický hybrid	Opakování	α – chaconin [mg.kg ⁻¹]	α – solanin [mg.kg ⁻¹]	TGA v čerstvé hmotě [mg.kg ⁻¹]	TGA v sušině [mg.kg ⁻¹]
REG 28FI	a	48,174	46,705	94,879	451,504
	b	83,653	73,4	157,053	932,065
REG 28FII ^B	a	18,845	17,557	36,402	204,414
	b	34,764	33,342	68,106	398,304
REG 28FII	a	64,582	55,147	119,729	659,446
	b	113,85	98,367	212,217	1017,58
REG 29FI	a ^A	86,838	91,747	178,585	938,193
	b	58,528	59,164	117,692	654,972
REG 30FII	a	120,595	106,648	227,243	997,818
	b	103,579	96,285	199,864	993,903
REG 31FI	a	84,13	55,631	139,761	797,723
	b ^A	108,146	69,991	178,137	1201,84
REG 32FI ^B	a	44,906	46,62	91,526	454,833
	b	24,12	24,456	48,576	243,172
REG 34FI	a	127,03	110,756	237,786	1353,36
	b	77,084	76,608	153,692	986,153
REG 34FII ^B	a	33,977	31,119	65,096	278,641
	b	35,608	33,064	68,672	293,019
REG 34FII ^B	a	97,675	87,592	185,267	975,397
	b	70,141	63,75	133,891	681,691

Somatický hybrid	Opakování	α – chaconin [mg.kg ⁻¹]	α – solanin [mg.kg ⁻¹]	TGA v čerstvé hmotě [mg.kg ⁻¹]	TGA v sušině [mg.kg ⁻¹]
REG 35FI	a	59,652	52,672	112,324	695,419
	b	70,308	59,39	129,698	881,46
REG 38FI	a	78,307	85,788	164,095	748,609
	b	35,371	34,219	69,59	312,063
REG 38FII	a	57,988	57,007	114,995	482,807
	b	60,393	57,774	118,167	455,049
REG 38FII	a	50,331	45,99	96,321	410,034
	b	31,055	33,848	64,903	314,315
REG 43FI	a	85,77	88,568	174,338	1218,04
	b	79,185	75,128	154,313	752,379
REG 43FII	a	57,374	75,69	133,064	594,46
	b	77,989	89,246	167,235	637,168
REG 44FI ^B	a	69,824	72,812	142,636	730,343
	b	71,734	76,994	148,728	775,19
REG 46FI	a	85,35	82,897	168,247	786,568
	b	76,635	83,542	160,177	932,671
REG 47FI	a	95,17	124,28	219,45	1270,63
	b	121,207	168,389	289,596	1668,66
REG 48FI	a ^A	107,359	138,459	245,818	1778,84
	b	90,327	102,123	192,45	1101,23
REG 48FI	a	42,814	51,112	93,926	640,696
	b	92,044	114,688	206,732	1508,33
REG 67FI	a ^A	104,943	126,1	231,043	1773,84
	b	70,14	78,544	148,684	967,743
REG 72FI ^B	a	49,757	57,347	107,104	701,126
	b	64,99	65,493	130,483	912,852

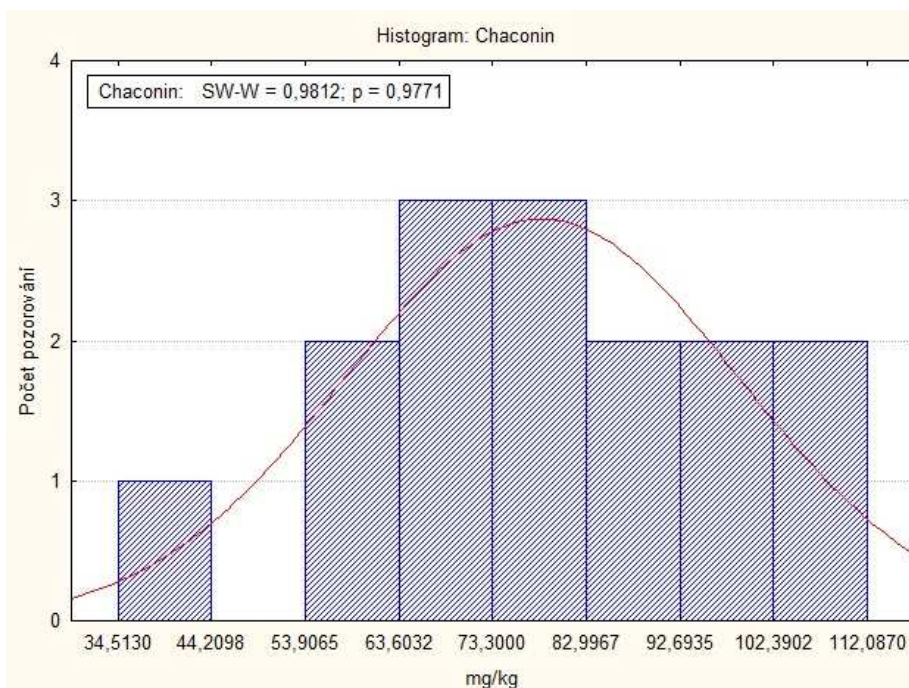
Tab. 7.: Průměrné obsahy α – chaconinu, α – solaninu, TGA v čerstvé hmotě, sušiny a TGA v sušině u jednotlivých sledovaných genotypů somatických hybridů. Ve sloupci „TGA v čerstvé hmotě [mg.kg⁻¹]“ jsou červeně označeny ty genotypy, jejichž průměrný obsah TGA v čerstvé hmotě překročil legislativní limit 200 mg.kg⁻¹.

Somatický hybrid	α – chaconin [mg.kg ⁻¹]	α – solanin [mg.kg ⁻¹]	TGA v čerstvé hmotě [mg.kg ⁻¹]	Sušina [%]	TGA v sušině [mg.kg ⁻¹ sušiny]
REG 28F	77,56	68,40	145,97	19,22	765,15
REG 29F	72,68	75,46	148,14	18,50	796,58
REG 30F	112,09	101,47	213,55	21,44	995,86
REG 31F	96,14	62,81	158,95	16,17	999,78
REG 32F	34,51	35,54	70,05	20,05	349,00
REG 34F	92,98	84,68	177,66	17,95	999,15
REG 35F	64,98	56,03	121,01	15,43	788,44
REG 38F	58,01	58,70	116,71	23,43	499,63
REG 43F	75,08	82,16	157,24	20,86	800,51
REG 44F	70,78	74,90	145,68	19,36	752,77
REG 46F	80,99	83,22	164,21	19,28	859,62
REG 47F	108,19	146,33	254,52	17,31	1469,64
REG 48F	83,14	101,60	184,73	14,92	1257,27
REG 67F	87,54	102,32	189,86	14,19	1370,79
REG 72F	57,37	61,42	118,79	14,79	806,99

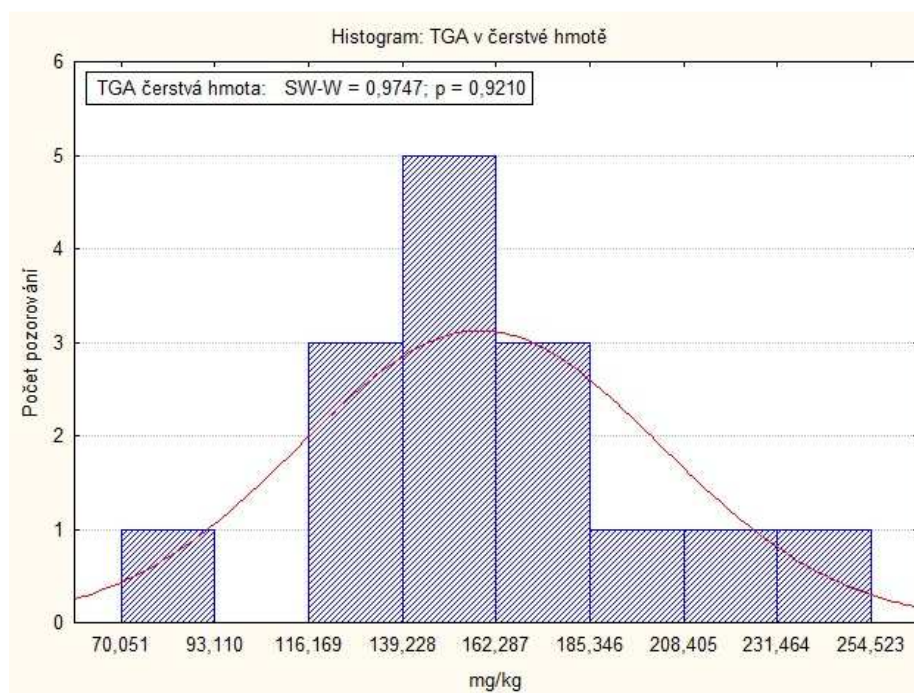
Graf 2.: Histogram znázorňující četnost výskytu hodnot spadajících do jednotlivých intervalů stupnice pro α – solanin.



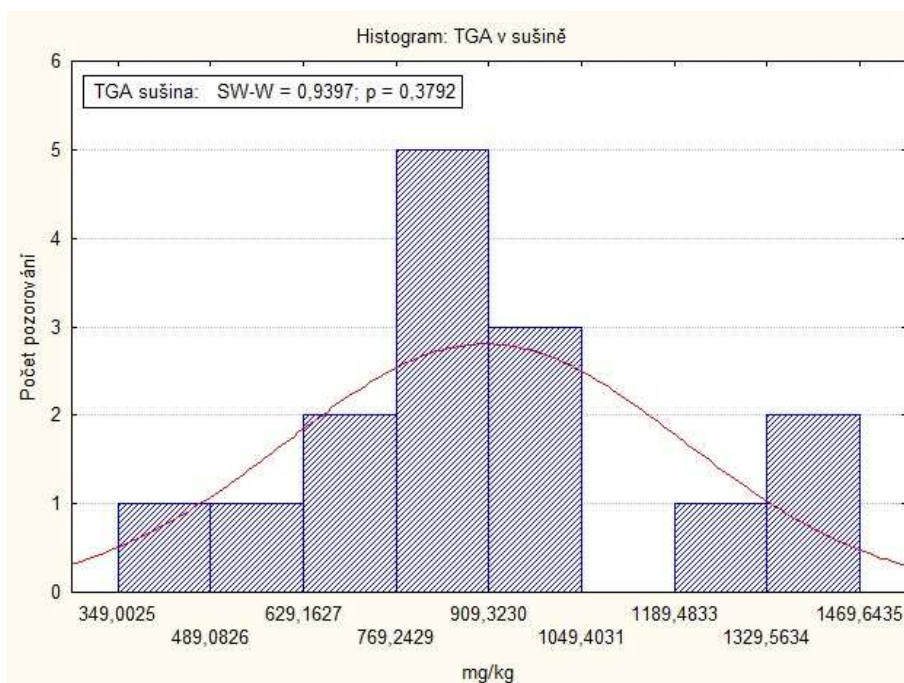
Graf 3.: Histogram znázorňující četnost výskytu hodnot spadajících do jednotlivých intervalů stupnice pro α – chaconin.



Graf 4.: Histogram znázorňující četnost výskytu hodnot spadajících do jednotlivých intervalů stupnice pro TGA v čerstvé hmotě.



Graf 5.: Histogram znázorňující četnost výskytu hodnot spadajících do jednotlivých intervalů stupnice pro TGA v sušině.



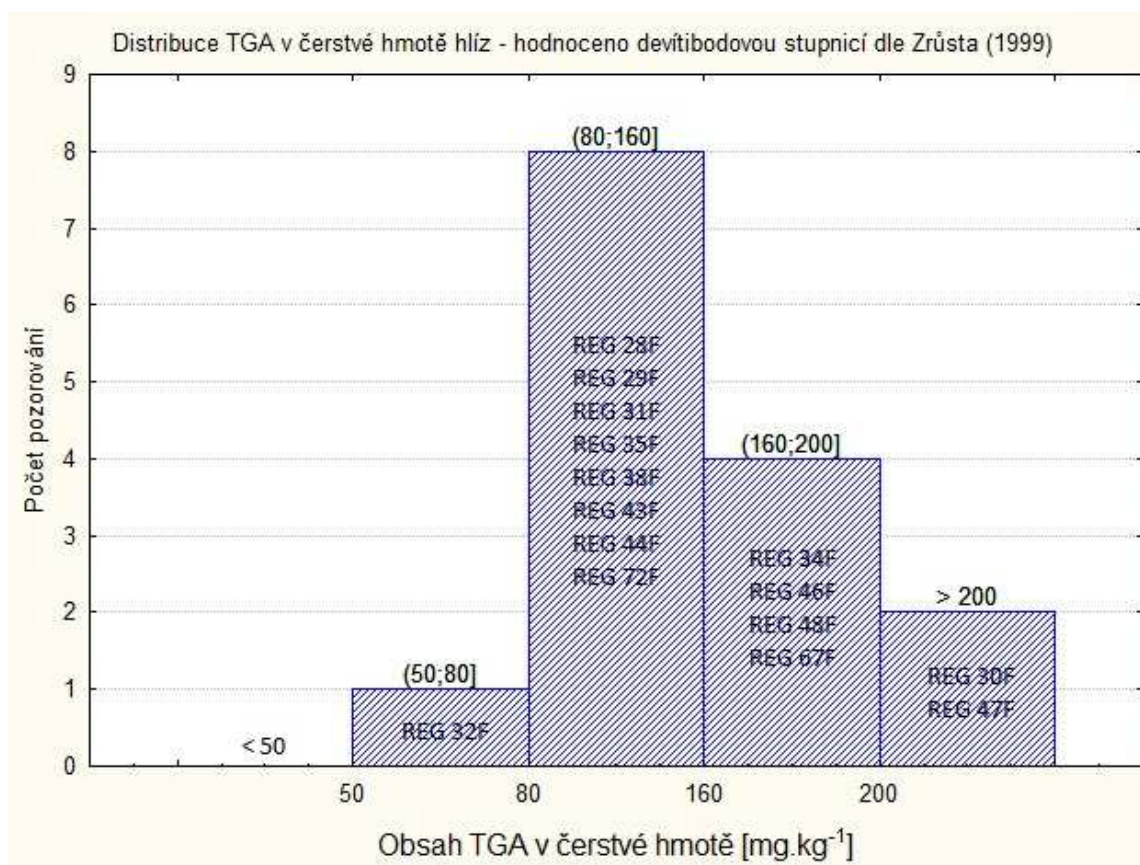
Tab. 8.: Průměrné hodnoty všech zkoumaných genotypů, minimální a maximální hodnoty získané od těchto somatických hybridů pro znaky obsah α – chaconinu, obsah α – solaninu, obsah TGA v čerstvé hmotě, sušina a obsah TGA v sušině. Výsledky byly získány na základě Tab. 7.

Sledovaný znak	α – chaconin [mg.kg ⁻¹]	α – solanin [mg.kg ⁻¹]	TGA v čerstvé hmotě [mg.kg ⁻¹ sušiny]	Sušina [%]	TGA v sušině [mg.kg ⁻¹ sušiny]
Průměr	78,14	79,67	157,80	18,19	900,75
MIN	34,51	35,54	70,05	14,19	349
MAX	112,09	146,33	254,52	23,43	1469,64
R	77,58	110,79	184,47	9,24	1120,64
s_x	20	26	44	3	299
v_k [%]	25,6	32,63	27,88	16,49	33,19

Tab. 9.: Četnost dosažených bodů při hodnocení obsahu GA devítibodovou stupnicí dle Zrůsta (1999). Výsledky byly získány na základě Tab. 7.

Body (obsah GA v mg.kg ⁻¹)	Četnost	Procentuelní zhodnocení [%]
9 (< 50)	0	0
7 (50 – 79)	1	6,667
5 (80 – 159)	8	53,333
3 (160 – 200)	4	26,667
1 (> 200)	2	13,333

Graf 6. : Distribuce TGA v čerstvé hmotě hlíz ohodnocená devítibodovou stupnicí dle Zrůsta (1999).



6. DISKUZE

6.1. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ MĚŘENÍ S LEGISLATIVNÍM LIMITEM

Jak je z tabulek a grafů uvedených v části 5 této práce („Výsledky“) patrné, byl obsah glykoalkaloidů v genotypech somatických hybridů brambor (*Solanum tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) testovaných v této práci velmi kolísavý. Nejmarkantněji je tato kolísavost vidět na obsazích TGA v sušině, které jsou zaznamenány v Tab. 7. Výsledky se pohybovaly v rozmezí 349,0 mg.kg⁻¹ až 1469,64 mg.kg⁻¹. Tuto variabilitu potvrzuje i hodnota variačního koeficientu, která byla nejvyšší ze sledovaných charakteristik, jak ukazuje Tab. 8. Pro lidskou potřebu je však užitečnější hodnotit obsahy GA v čerstvé hmotě brambor, jelikož v této podobě bývají nejčastěji konzumovány. Výsledky ukázaly, že průměrné hodnoty obsahů α – chaconinu v čerstvých hlízách se u sledovaných genotypů pohybovaly v rozmezí od 34,51 mg.kg⁻¹ do 112,09 mg.kg⁻¹ hlíz. U α – solaninu byl v čerstvých hlízách zaznamenán interval průměrů obsaženého množství od 35,54 mg.kg⁻¹ do 146,33 mg.kg⁻¹. Podobně široké rozmezí bylo zaznamenáno i u průměrů TGA v čerstvé hmotě, konkrétně se jednalo o hodnoty od 70,05 mg.kg⁻¹ do 254,52 mg.kg⁻¹. Právě obsah TGA v čerstvých hlízách je nejdůležitějším ukazatelem kvality hlíz z hlediska lidské konzumace, jelikož legislativní limit stanovuje nejvyšší přípustné množství glykoalkaloidů 200 mg.kg⁻¹ hlíz (Vyhláška č. 305/2004 Sb. ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách). Výsledky ukázaly, že průměrný obsah TGA v hlízách byl 157,80 mg.kg⁻¹, nicméně u 2 genotypů (REG 30F, REG 47F) byl tento limit překročen. Navíc pokud by byly brány v úvahu konkrétní hlízy, pak byl limit překročen u 8 ze 46 hlíz (23 somatických hybridů, každý ve 2 opakováních), tedy v 17,39 % testovaných vzorků.

6.2. ZHODNOCENÍ PRŮBĚHU MĚŘENÍ

Vhodnější je pro hodnocení užívat zprůměrovaná data, jelikož jak uvedl Zrůst (2004a), variabilita obsahů GA v hlízách může kolísat až o 60% kvůli působení mnohých faktorů. Nicméně v případě této práce mohou být i průměrné výsledky pro jednotlivé genotypy velmi zkreslené, jelikož bylo použito méně hlíz k testování, než je doporučováno. Mělo by být použito 15 vzorků od každého genotypu (Kvasnička, 1998), avšak v této práci množství použitých hlíz konkrétního genotypu kolísalo od 1 do 6, neboť trsy regenerantů nesly omezené množství hlíz. Z hrubých výsledků získaných od konkrétních somatických hybridů bylo také několik hodnot odebráno, jelikož se velmi výrazně lišily od ostatních dat

naměřených u příslušného genotypu a ovlivnily by negativně kvalitu následných statistických výpočtů. Lze usuzovat, že toto kolísání mohlo být způsobeno náhodně v průběhu přípravy vzorků a měření. Jako nejpravděpodobnější se jeví možnost, že ve výrazně se odlišujících vzorcích došlo k zařazení větších či menších množství slupek do homogenátů, než u ostatních vzorků. Z tohoto důvodu je nutné při dalších budoucích měřeních věnovat zvýšenou pozornost stejnorodosti směsí.

Další faktor, který mohl ovlivnit kvalitu výsledků, je skladování hlíz. Hlízy byly uskladněny v temnu a při teplotě 4 °C. Ani teplota ani světlo tedy nemohly obsah GA ovlivnit, jelikož Rosenfeld et al. (1995) a Haase (2010) prokázali, že v temnu a při takovéto teplotě nenastávají v obsahu GA v hlízách výrazné změny. Nicméně uskladnění trvalo 6 měsíců, takže mohlo dojít minimálně ke změnám v obsahu sušiny oproti čerstvě vyoraným hlízám. Vhodnější by bylo provést testy co nejdříve po sklizni.

6.3. PRAVDĚPODOBNOST VÝSKYTU MINORITNÍCH GLYKOALKALOIDŮ

V několika případech se hladiny TGA legislativnímu limitu značně přibližovaly. Je tedy pravděpodobné, že v širším pojetí pojmu TGA, kdy by nebyla brána jako směrodatná pouze suma α – solaninu a α – chaconinu, ale také ostatní minoritní GA, které se v hlízách mohou nacházet, by byl tento limit taktéž překročen a hlízy by tedy byly nevhodné ke konzumu. Hypotéza, že v hlízách somatických hybridů se mohou nacházet i další typy glykoalkaloidů, vychází z několika studií dokládajících tento fakt. Distl a Wink (2009) ve své práci přímo uvádějí, že při křížení kulturních odrůd brambor s planými druhy rodu *Solanum*, což je případ této práce, může dojít k nárůstu obsahu GA či k tvorbě jiných typů těchto látek v nově vzniklých genotypech, jelikož plané druhy rodu *Solanum* vykazují širší škálu těchto látek. Tento předpoklad se shoduje i se studií, kterou provedli Laurila et al. (1996). V této studii bylo provedeno křížení *Solanum tuberosum* + *Solanum brevidens*. Rodičovské rostliny *S. tuberosum* obsahovaly v listech aglykony solanidin a solanthren, kdežto *S. brevidens* aglykon tomatidin. U všech vzniklých somatických hybridů byl nalezen navíc i aglykon demissidin, který ale nebyl prokázán u žádného z rodičů. Proto je pravděpodobné, že v křížení *S. tuberosum* + *S. bulbocastanum* z této práce mohlo dojít také k obdobnému jevu. Nicméně měření týkající se výskytu těchto minoritních glykoalkaloidů nebylo u sledovaných somatických hybridů prozatím provedeno a bylo by vhodné se této části problematiky glykoalkaloidů v budoucnu také věnovat.

6.4. HODNOCENÍ OBSAHU GLYKOALKALOIDŮ DEVÍTIBODOVOU STUPNICÍ

Po zhodnocení obsahu GA podle devítibodové stupnice dle Zrůsta (1999) bylo zjištěno, že u 4 genotypů (REG 34F, REG 46F, REG 48F, REG 67F) bylo dosaženo 3 bodů (vysoký obsah GA), což představuje 26,667 %, a ve 2 případech (REG 30F, REG 47F) dokonce 1 bodu (velmi vysoký obsah GA), což se rovná 13,333 %. V součtu tedy 40 % sledovaných genotypů spadá do kategorií odrůd, které autor nedoporučuje pěstovat. To, že podle Zrůsta (1999) nejsou vhodné ke konzumaci ani odrůdy, které dosahují 3 bodů, je odůvodněno tím, že dochází ke značné variabilitě obsahů GA v rámci ročníku, stanoviště a podobně. Nicméně v případě této práce lze uvažovat i o další hrozbě překročení hladiny 200 mg.kg⁻¹, a to z již výše zmíněného důvodu, že hrozí také výskyt určitých množství neměřených minoritních alkaloidů, které by mohly navyšovat obsah TGA.

6.5. HODNOCENÍ STATISTICKÝCH CHARAKTERISTIK

Pokud je hodnocen sledovaný soubor jako celek, je nutné použít další statistické výpočty kromě průměrných hodnot obsahů GA u konkrétních genotypů.

Maximální dosažená hodnota variačního koeficientu v_k byla 33,19 %, a to u obsahu TGA v sušině. Jak již bylo zmíněno, právě výsledky měření obsahů TGA v sušině vykazovaly nejvyšší kolísavost hodnot. Toto potvrzuje i krabicový graf na Obr. III. v samostatných přílohách, z něhož je patrné, že se v hodnotách TGA v sušině vyskytovaly i odlehlé hodnoty, přičemž u obsahů α – chaconinu, α – solaninu a TGA v čerstvé hmotě se tyto hodnoty nevyskytly.

Jednou z nejdůležitějších charakteristik je normalita rozdělení četností naměřených hodnot. Tyto hodnoty byly rozděleny do intervalů, jejichž počet byl vypočítán ze vztahu uvedeného v části 4.3. této práce („Statistické zhodnocení výsledků“). Jako normální rozdělení se bere distribuce hodnot, jejíž hustota pravděpodobnosti je $p \geq 0,9500$. Této pravděpodobnosti dosáhl ze sledovaných vlastností somatických hybridů jen obsah α – chaconinu v čerstvé hmotě. Hodnoty blízké se k 0,95 dosáhl obsah TGA v čerstvé hmotě, a to konkrétně 0,921. Obsah v α – chaconinu čerstvé hmotě tedy vykazuje normální rozdělení hodnot a obsah TGA v čerstvé hmotě se mu velmi blíží. Ostatní dvě charakteristiky, obsah α – solaninu v čerstvé hmotě a obsah TGA v sušině, již měly hustotu pravděpodobnosti výrazně nižší. Pro α – solanin $p = 0,3211$ a pro TGA v sušině $p = 0,3792$. Zde se tedy o normální rozdělení nejedná. U α – solaninu to může být způsobeno tím, že naměřené hodnoty více kolísaly oproti α – chaconinu. To vyplývá z variačního rozpětí i ze směrodatné odchylky, obojí bylo vyšší u α – solaninu než u α – chaconinu, který vykazoval normální distribuci

hodnot. TGA v sušině vykazují ve všech charakteristikách vysokou nesourodost, jak již bylo popsáno výše.

6.6. POTENCIÁL ZKOUMANÝCH GENOTYPŮ

Sledované genotypy somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) byly zkříženy za účelem zjištění, zda *Solanum bulbocastanum* v rodičovské pozici napomáhá k rezistenci proti plísni bramborové (*Phytophthora infestans*). Výsledky z výzkumů zaměřených na tuto problematiku získané již dříve na Katedře genetiky České zemědělské univerzity v Praze prokázaly vysokou odolnost k *Phytophthora infestans*, proto mají tyto genotypy šlechtitelský potenciál.

Nicméně jak dokazuje tato práce, nejsou tyto genotypy minimálně ze 40 % vhodné pro konzumní účely, jelikož obsah glykoalkaloidů v nich není stabilizován tak, aby odpovídal bezpečnostním legislativním předpisům. Navíc při zkušební ochutnávce testovaných hlíz bylo zjištěno, že vykazují vysokou hořkost a jsou tedy nepoživatelné i ze sensorických důvodů. Do budoucna by tedy bylo možné je využívat pro zvyšování odolnosti vůči plísni, ale zároveň se zabývat jejich konzumními vlastnostmi, aby se předešlo nežádoucím efektům těchto genotypů.

Ačkoliv byla prokázána zvýšená odolnost vůči plísni, nebyl během trvání porostu pozorován žádný výrazný efekt na aktivitu mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Tím nebyly potvrzeny výsledky autorů Smith et al. (2001) ani Tömösközi – Farkas et al. (2006), kteří ve svých studiích prokázali negativní vliv GA na aktivitu škůdců a patogenů. Nicméně to, že mandelinka bramborová nebyla odpuzována, mohlo být způsobeno tím, že nebylo dosaženo dostatečné koncentrace GA v nadzemních částech rostlin potřebné k tomuto efektu. Hlízy byly sice hořké a vykazovaly zvýšený obsah GA, ale vše bylo posuzováno z hlediska lidské výživy, pro škůdce mohou být limitní hodnoty GA značně odlišné. Navíc nebyl v této práci zkoumán obsah GA v nadzemních částech rostlin, kterými se mandelinka bramborová živí, takže je možné, že byl velmi rozdílný od obsahu naměřeného v hlízách a nelze tedy objektivně posoudit, proč nebyl tento škůdce nijak ovlivněn. Je ale pravděpodobné, že obsah GA v nadzemních částech byl vyšší než v hlízách, jelikož existují studie, které tento jev prokázaly. Např. Smith et al. (1996) uvedli, že v listech se průměrně nachází glykoalkaloidů 230 – 1000 mg.kg⁻¹ čerstvé hmoty, kdežto v hlízách 10 – 150 mg.kg⁻¹ čerstvé hmoty.

7. ZÁVĚR

Závěry vyplývající z této práce lze shrnout v několika bodech:

- Stanovení obsahu α – solaninu a α – chaconinu u somatických hybridů brambor (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) bylo úspěšné, ačkoliv mohlo dojít k jistým nepřesnostem v měření z různých v diskusi popsanych důvodů.

- Při vyjadřování obsahu TGA v hlízách jako součtu α – solaninu a α – chaconinu mohlo také dojít k určitým chybám, a to z důvodu možného výskytu jistého množství minoritních glykoalkaloidů, které bývají přítomny v planých odrůdách brambor a také v jejich křížencích s kulturními odrůdami. Tyto minoritní glykoalkaloidy však nebyly v této práci sledovány.

- Výsledky ukázaly, že u 2 genotypů (REG 30F, REG 47F) byl překročen legislativní limit 200 mg.kg^{-1} čerstvých hlíz. Při detailním pohledu na jednotlivé testované hlízy byl tento limit překročen u 8 ze 46 hlíz, což představuje 17,39 % testovaných vzorků.

- Ještě více vzorků, konkrétně 40 %, vykazovalo hladiny GA, při kterých jsou brambory po zhodnocení devítibodovou stupnicí dle Zrůsta (1999) označeny jako nevhodné ke konzumu.

- Nejvyšší variabilitu mezi sledovanými charakteristikami vykazoval obsah TGA v sušině, zatímco obsah α – chaconinu měl normální distribuci hodnot.

- Genotypy sledované v této práci jsou nevhodné pro konzumaci z důvodu kolísavých hladin glykoalkaloidů, které mohou překročit legislativní limit. Dále jsou pro konzumaci nevhodné z důvodu jejich značné hořkosti a tedy špatných sensorických vlastností pro konzumenta. Dříve však již bylo zjištěno, že somatické hybridy těchto genotypů vykazují vysokou odolnost vůči plísni bramborové (*Phytophthora infestans*) a mají tedy další šlechtitelský potenciál.

8. SEZNAM LITERATURY

Coria, N. A., Sarquís, J. I., Granados, C. 2011. Effect of α – solanine, α – chaconine and solanidine on the growth of *in vitro* cultured potato (*Solanum tuberosum*) L. seedlings. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 14. 323 – 330.

Česko. Vyhláška č. 305/2004 Sb. ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In: Sbírka zákonů České republiky. 2004. Částka 100/2004. s. 6398. Dostupné také z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-ostatni_uplna-zneni_vyhlaska-2004-305.html>

Distl, M., Wink, M. 2009. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber - Bearing Solanum Species by HPLC and LC – ESI – MS. Potato Research. 52. 79 – 104.

FAO Statistical Yearbook [online]. Rome. FAO Statistics Division. 2010 [cit. 2012 – 03 - 12]. Dostupné z <<http://www.fao.org/docrep/015/am081m/am081m00.htm>>

Friedman, M., Henika, P. R., Mackey, B. E. 2003. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non - pregnant and pregnant mice. Food and Chemical Toxicology. 41. 61 – 71.

Friedman, M. 2004. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. Journal of Chromatography A. 1054. 143 – 155.

Griffiths, D. W., Bain, H., Deighton, N., Robertson, G. W., Finlay, M., Dale, B. 2000. Photo induced synthesis of tomatidenol - based glycoalkaloids in *Solanum phureja* tubers. Phytochemistry. 53. 739 – 745.

Haase, N. U. 2010. Glycoalkaloid Concentration in Potato Tubers Related to Storage and Consumer Offering. Potato Research. 53. 297 – 307.

Högy, P., Fangmeier, A. 2009. Atmospheric CO₂ enrichment affects potatoes: 2. Tuber quality traits. *European Journal of Agronomy*. 30. 85 – 94.

Jensen, P. H., Jacobsen, O. S., Henriksen, T., Strobel, B. W., Hansen, H. Ch. B. 2009. Degradation of the Potato Glycoalkaloids – α – Solanine and α - Chaconine in Groundwater. *Bull Environ Contam Toxicol*. 82. 668 – 672.

Kodíček, M. Biochemické pojmy [online]. VŠCHT Praha. 2004 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/>.

Krits, P., Fogelman, E., Ginzberg, I. 2007. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolit genes. *Planta*. 227. p. 143 – 150.

Kvasnička, F. 1998. In: Zrůst, J. 2004a. Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. Praha. 54 s.

Laurila, J., Laakso, I., Valkonen, J. P. T., Hiltunen, R., Pehu, E. 1996. Formation of parental – type and novel glycoalkaloids in somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. *Plant Science*. 118. 145 – 155.

Lu, M. K., Shih, Y. W., Chien, T. T. Ch., Fang, L. H., Huang, H. Ch., Chen, P. S. 2010. α - Solanine Inhibits Human Melanoma Cell Migration and Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase-2/9 Activities. *Biol. Pharm. Bull.* 33 (10) 1685 – 1691.

Novák, J., Skalický, M. 2009. Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 978 – 80 – 904011 – 5 – 0.

Přichystalová - Fialková, V., Zrůst, J., Hlušek, J., Jůzl, M. 1999. Obsah α – chaconinu a α – solaninu v hlízách velmi raných odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.). In: Vědecké práce - 13. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod. Havlíčkův Brod. s. 91 – 102. ISBN: 80 – 902567 – 1 – 6.

Rayburn, J. R., Friedman, M., Bantle, J. A. 1995. Synergistic Interaction of Glycoalkaloids α – Chaconine and α – Solanine on Developmental Toxicity in *Xenopus* Embryos. *Food and Chemical Toxicology*. 33 (12). 1013 – 1019.

Rosenfeld, H. J., Sundell, H. A., Lea, P., Ringstad, M. 1995. Influence of packaging materials and temperature on the glycoalkaloid content of potato tubers. *Food Research International*. 28 (5). 481 – 484.

Slavík, B. 2000. *Solanaceae* Juss. – lilkovité. In: Slavík, B. (ed.). *Květena české republiky 6*. Academia. Praha. s. 245 – 247. ISBN: 80 – 200 – 0306 – 1.

Smith, D. B., Roddick, J. G., Jones, J. L. 1996. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. *Trends in Food Science & Technology*. 7. 126 – 131.

Smith, D. B., Roddick, J. G., Jones, J. L. 2001. Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry*. 57. 229 – 234.

Sýkorová, S., Bradová, J., Cuhra, P., Lachman, J., Novotný, F. 2008. Nové směry v analytice rostlinných produktů. In: Prugar, J. (ed.). *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s. ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV. Praha. s. 303 – 314. ISBN: 978 – 80 – 86576 – 28 – 2.

Tömösközi - Farkas, R., Daood, H. G., Polgár, Zs., Hajós, Gy. 2006. Determination of Glycoalkaloids in Hungarian Potatoes by HPLC. *Chromatographia Supplement*. 63. S115 – S118.

Tomšovic, P. 2000. *Solanum tuberosum* L. – lilek brambor, brambor obecný. In: Slavík, B. (ed.). *Květena české republiky 6*. Academia. Praha. s. 274 - 275. ISBN: 80 – 200 – 0306 – 1.

Velíšek, J., Cejpek, K. 2008. *Biosynthesis of Food Components*. OSSIS. Tábor. p. 512. ISBN: 978 – 80 – 86659 – 12 – 1.

Vidner, J., Dobiáš, K., Konrád, J., Dědič, P., Bareš, I., Sehnalová, J. 1987. Klasifikátor genus *Solanum* L. Výzkumný a šlechtitelský ústav bramborářský Havlíčkův Brod, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha – Ruzyně. Praha, 45 s.

Wink, M. 1997. Special Nitrogen Metabolism. In: Dey, P. M. (ed.). Plant biochemistry. Academic Press. San Diego. p. 439 – 486. ISBN: 0 – 12 – 214674 – 3.

Zrůst, J. 1997. Obsah glykoalkaloidů v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum* L.) ovlivněný pěstitelskými opatřeními a mechanickým poškozením. Rostlinná výroba. 11. 509 – 515.

Zrůst, J. 1999. Steroidní glykoalkaloidy v hlízách bramboru. Úroda. 47 (5). 18 – 19.

Zrůst, J., Horáčková, V., Přichystalová, V., Rejlková, M. 2003. Obsah glykoalkaloidů v potravinářských výrobcích z brambor. In: Dědič, P., Vokál, B. (eds.). Vědecké práce. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod. Havlíčkův Brod. s. 145 – 155. ISBN: 80 – 902567 – 8 – 3.

Zrůst, J. 2004a. Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit [online]. Praha. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. 31. ledna 2004 [cit. 2012 – 05 - 03] Dostupné z <<http://www.phytopsanitary.org/projekty/2003/vvf-19-03.pdf>>.

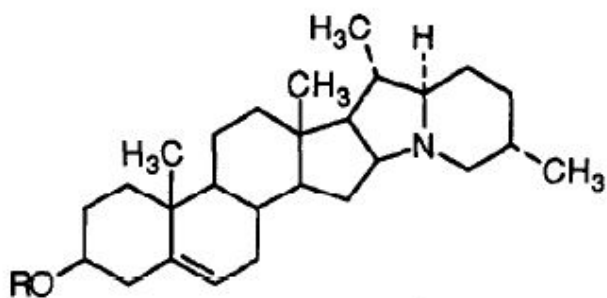
Zrůst, J. 2004b. Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor [online]. Praha. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. 30. listopadu 2004 [cit. 2012 – 05 - 03]. Dostupné z <<http://www.phytopsanitary.org/projekty/2004/vvf-05-04.pdf>>.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- ELISA – imunochemická enzymová analýza (enzyme linked immunosorbent assay)
- FI, FII – F je označení jedince vzniklého fúzí protoplastů; I a II jsou označení pokusných bloků na pozemku, kde byly rostliny pěstovány
- GA – glykoalkaloidy
- GC – plynová chromatografie (gas chromatography)
- HMGR – enzym 3 – hydroxy -3 – methylglutarylkoenzymA reduktáza
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
- MAX – maximální naměřená hodnota
- MIN – minimální naměřená hodnota
- PSS1 – enzym skvalensyntáza
- PVDF – polyvinyliden fluorid
- PVS1 – enzym vetispiradien(seskviterpen)cycláza
- REG – somatický hybrid vytvořený regenerací protoplastových kultur; regenerant
- SGA – steroidní glykoalkaloidy
- SW – Shapiro – Wilkův test
- TGA – celkové glykoalkaloidy (z anglického total glycoalkaloid)
- TLC – tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)

10. SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Obr. I.: Struktury hlavních glykoalkaloidů brambor (α - solaninu a α - chaconinu) a aglykonu solanidinu. Glu, Gal a Rham představují cukerné zbytky glukosu, galaktosu a rhamnosu (Smith et al., 1996).



R = H, Solanidine

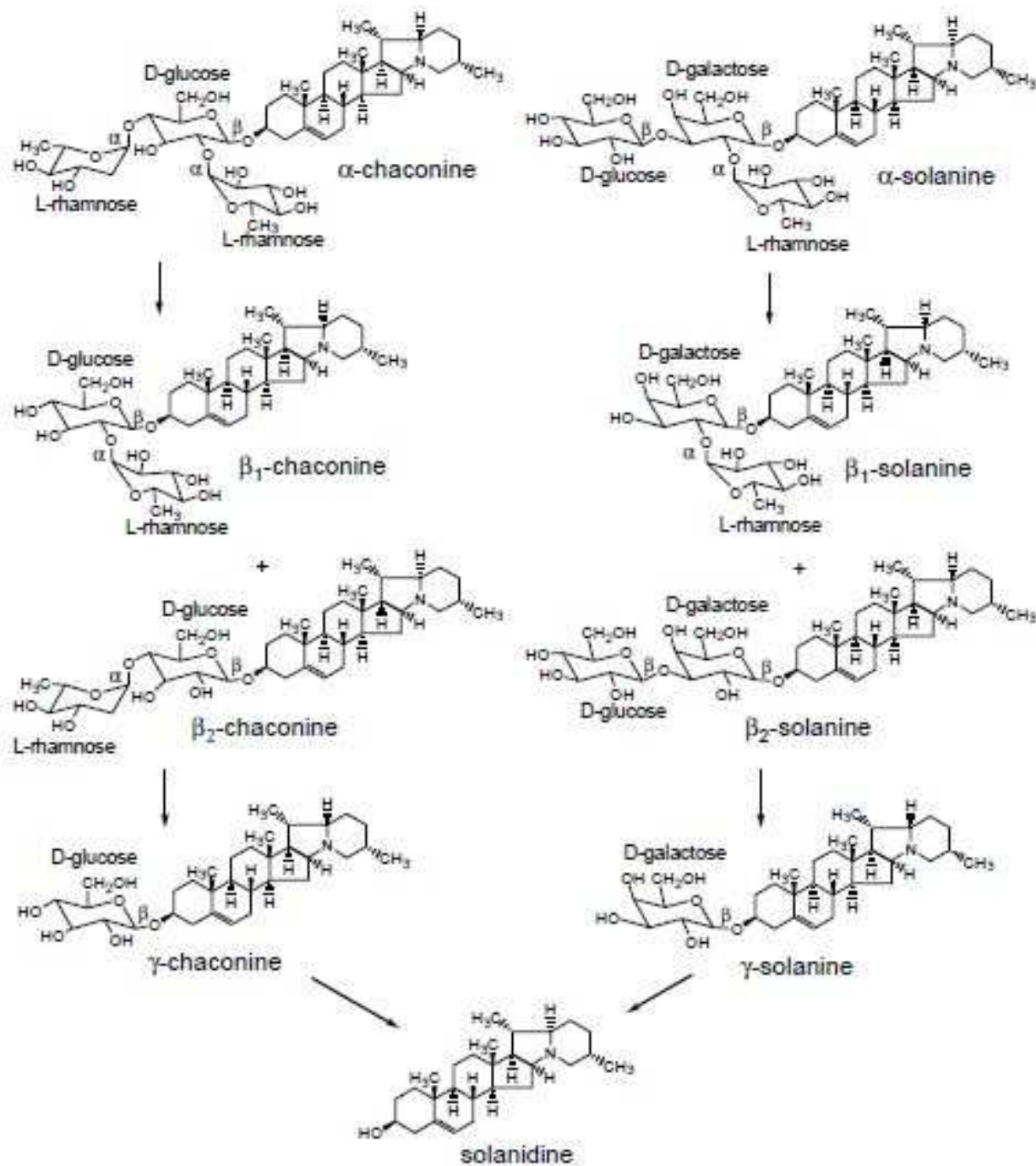
R = Rham — Gal — , α -Solanine

|
Glu

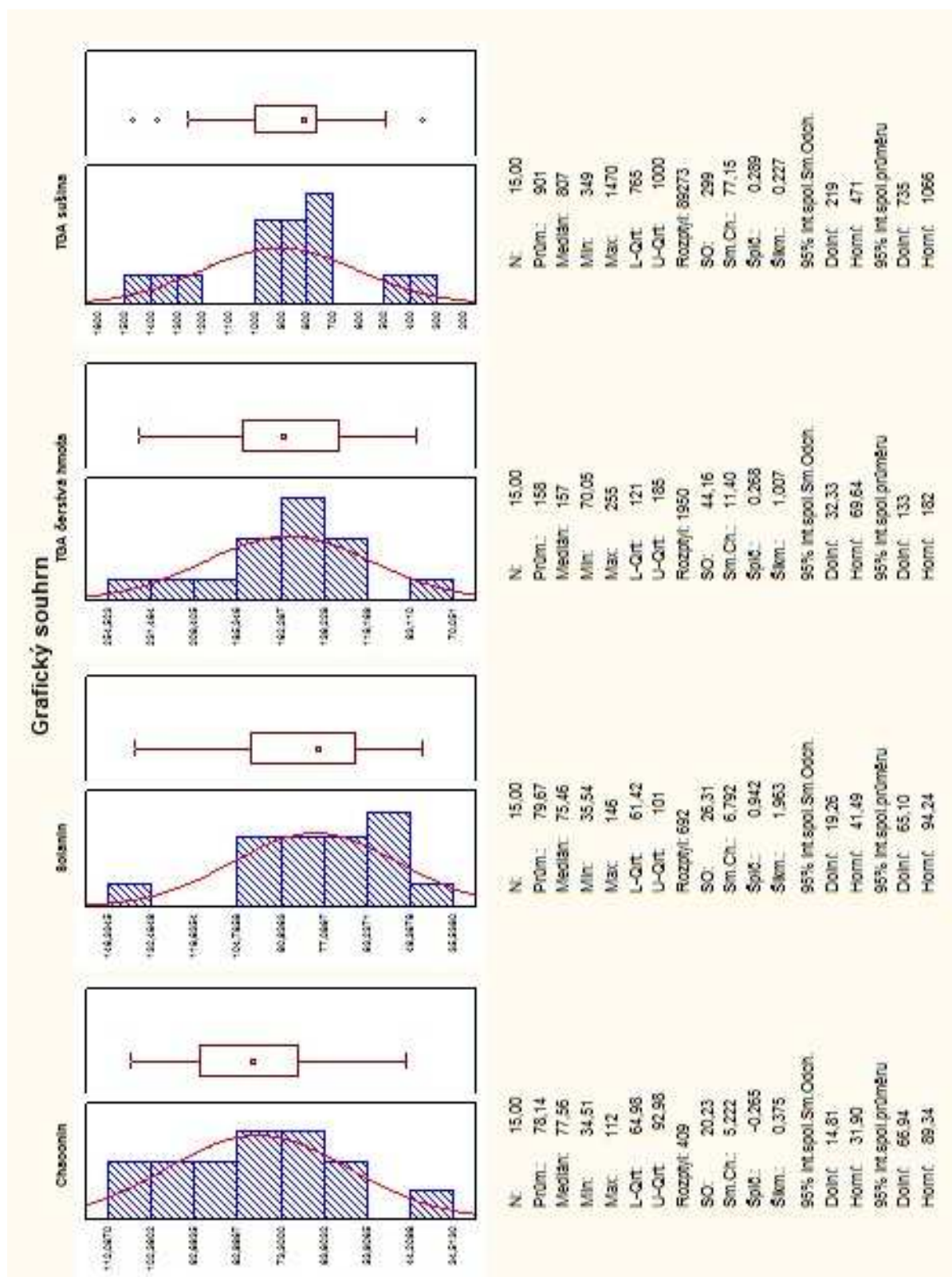
R = Rham — Glu — , α -Chaconine

|
Rham

Obr. II.: Struktura glykoalkaloidů α - chaconinu a α - solaninu a produktů jejich hydrolyzy (Friedman, 2004).



Obr. III.: Grafický souhrn a seznam statistických výpočtů pro znaky α – solanin, α – chaconin, TGA v čerstvé hmotě, TGA v sušině.



SEZNAM PŘÍLOH

Obr. I.: Struktury hlavních glykoalkaloidů brambor (α - solaninu a α - chaconinu) a aglykonu solanidinu (Smith et al., 1996).

Obr. II.: Struktura glykoalkaloidů α - chaconinu a α - solaninu a produktů jejich hydrolýzy (Friedman, 2004).

Obr. III.: Grafický souhrn a seznam statistických výpočtů pro znaky α – solanin, α – chaconin, TGA v čerstvé hmotě, TGA v sušině.