

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra:

Rostlinné výroby a agroekologie

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

Téma bakalářské práce

**OPTIMALIZACE POSTUPŮ HODNOCENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY
VYBRANÝCH ÚČINNÝCH LÁTEK VŮČI ZVOLENÉMU SPEKTRU
PATOGENŮ**

Autor bakalářské práce:

Michaela Hercoková

Vedoucí práce:

Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

2012

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela HERCOKOVÁ**
Osobní číslo: **Z09803**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Optimalizace postupů hodnocení antibakteriální aktivity
vybraných účinných látek vůči zvolenému spektru
bakteriálních patogenů**
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Bakalářská práce (BP) se bude zabývat optimalizací postupů hodnocení antibakteriální aktivity účinných látek (vybrané proteiny a peptidy hlíz bramboru, a komerčně dostupná antibiotika) vůči bakteriálním patogenům *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringe* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Vlastní řešení BP bude spočívat ve vypracování literárního přehledu se vztahem k řešené problematice - zmapování metod hodnocení antibakteriální aktivity přírodních látek a podmínek kultivace zvolených bakteriálních organismů. V experimentální části bude modelově hodnocena vhodnost různých podmínek kultivace na zvolené modelové bakteriální patogeny a bude optimalizován postup určení koncentrace bakteriální suspenze. Z metod hodnocení antibakteriální aktivity bude pozornost soustředěna především na optimalizaci tzv. resazurinového testu a testu založeném na měření optické hustoty bakteriální suspenze v přítomnosti konkrétní účinné látky. Optimalizace těchto metod bude spočívat v hodnocení vhodnosti složení reakční směsi, koncentrace jednotlivých složek reakční směsi a časových intervalů hodnocení bakteriálního růstu u jednotlivých druhů bakterií. Získané výsledky budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány výpočetní technikou do podoby fotodokumentace, tabulek a grafů. Součástí řešení práce bude diskuse získaných výsledků s dostupnými informacemi literárních pramenů.

Rozsah grafických prací: **15 stran**
Rozsah pracovní zprávy: **50 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

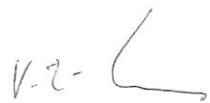
- SITOHY M., OSMAN A. (2010): Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Food Chemistry 120: 66-73.
- SARKER S.D., NAHER L., KUMARASANY L. (2007): Microtitre plate-based assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods 42(4): 321-324.
- SHARMA N., GRUSZEWSKI H.A., PARK S.-W., HOLM D.G, VIVANCO J.M. (2004): Purification of an patatin with antimicrobial activity against Phytophthora infestans. Plant Physiology and Biochemistry 42:647-655.
- BÁRTA J., ČURN V. (2004): Potato tuber proteins - classification, characterization, importance. Chem. Listy 98, 373-378.
- NEUBAUEROVÁ T., MACKOVÁ M., MACEK T., KOUTEK B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. Chem. Listy 103: 460-468.
- Literatura získaná na základě vlastní práce s databázovými a dalšími informačními systémy.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Veronika Bártová, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie


Konzultant bakalářské práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání bakalářské práce: **18. února 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentů 13
370 01 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. února 2011

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenu a literatury, uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

27. dubna 2012

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Veronice Bártové, PhD. a doc. Ing. Janu Bártovi, PhD. za odborné rady a doporučení při psaní této práce. Dále také Ing. Andree Kamenové a Ing. Adéle Brabcové za odborné vedení a pomoc v experimentální části práce.

Abstrakt

Tato práce pojednává o optimalizaci postupů hodnocení antibakteriální aktivity účinných látek vůči bakteriálním patogenům *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Literární rešerše se zabývá proteiny hlíz brambor, především proteiny s antibakteriální aktivitou, dále je uveden stručný přehled mechanismů účinku rostlinného obranného systému vůči patogenním mikroorganismům a účinku antimikrobiálních látek na bakteriální patogeny. Experimentální část práce se zabývá optimalizací metody stanovení titru bakterií pomocí McFarlandových standardů, stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody a hodnocením antibakteriální účinnosti vybrané skupiny aktivních látek pomocí resazurinového testu. Bylo zjištěno, že v souvislosti s rostoucí optickou densitou měřenou spektrometrem při 620 nm roste zároveň i koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml). U použitých proteinů hlíz brambor odrůd Bella a Westamyl byla pomocí metody SDS-PAGE identifikována skupina bílkovin patatinového komplexu a skupina inhibitorů proteas, u kterých došlo vlivem esterifikace methylocí v posunu molekulové hmotnosti. Antimikrobiální aktivita těchto proteinů byla ověřena v resazurinovém testu, kde byla zjištěna inhibiční schopnost modifikovaných hlízových proteinů odrůd Bella a Westamyl ve vyšších koncentracích (10 mg/ml) vůči bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomati*.

Klíčová slova: patatin, antimikrobiální proteiny, inhibitory proteáz, bakteriální růst, proteiny hlíz brambor, obranný mechanismus rostliny

Abstract

The bachelor thesis deals with optimization of selected methods (e.g. evaluation of bacterial suspension concentration, Resazurin antibacterial assay) needed for evaluation of active substances antibacterial activity against pathogens *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Literature review contains information about potato tubers proteins, especially proteins with antibacterial activities, as well as a brief overview of mechanisms of action of plant defense system against pathogenic microorganisms and the effect of antimicrobial substances on bacterial pathogens. The experimental part deals with optimization of methods needed for evaluation of antibacterial activities of selected substances. Optimized were methods of McFarland Turbidity Standards, Most-probable number method and Resazurin antibacterial assay. It was found that increase of optical density, measured by spectrometer at 620 nm, is in direct correlation with increase of bacterial suspension concentration (CFU/ml). It was identified proteins of patatin complex and protease inhibitors by using SDS-PAGE method to evaluate potato tuber proteins of variety Bella and Westamyl and also changes of molar mass of the patatin proteins in relation of their modification were evaluated. Antimicrobial activity of these proteins was verified by resazurin antibacterial assay and ability of modified proteins of cultivars Bella and Westamyl in higher concentration (10 mg/ml) to inhibit growth of bacteria *Pseudomonas syringae*.

Key words: patatin, antimicrobial peptide, protease inhibitors, bacterial growth, potato tuber proteins, plant defense mechanism

Obsah

1	LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
1.1	Rostlina a stresové reakce	11
1.2	Antimikrobiální proteiny.....	16
1.3	Vybrané antimikrobiální proteiny rostlin.....	20
1.4	Proteiny hlíz bramboru (<i>Solanum tuberosum L.</i>).....	21
1.5	Použité bakteriální kultury	34
1.6	Resazurinový test	36
2.	MATERIÁL A METODY	37
2.1.	Bakteriální kultury	37
2.2.	Příprava modifikovaného proteinu hlíz bramboru	37
2.3.	SDS-PAGE analýza modifikovaného proteinu hlíz bramboru	37
2.4.	Stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody	38
2.5.	Stanovení titru bakterií pomocí McFarlandových standardů (<i>McFarland Turbidity Standards</i>).....	39
2.6.	Hodnocení antibakteriální aktivity vybraných látek pomocí resazurinového testu	40
2.7.	Statistické vyhodnocení získaných dat.....	40
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1.	Optimalizace postupů stanovení přesné koncentrace suspenze zvolených bakteriálních druhů	41
3.2.	Hodnocení resazurinového testu	47
4.	DISKUZE	52
5.	ZÁVĚR.....	54
6.	SEZNAM PŘÍLOH.....	55
7.	SEZNAM ZKRATEK	55
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

ÚVOD

V současné době se čím dál tím častěji řeší otázka rezistence mikroorganismů na antibiotika. Je tedy snaha hledat další a další nové látky, které by vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Pozornost je nyní soustředěna i na hlízy bramboru (*Solanum tuberosum L.*), ve kterých se prokázala přítomnost několika typů antimikrobiálních látek.

Literární rešerše bakalářské práce se zabývá obrannou reakcí rostliny na přítomnost fytopatogena, dále antimikrobiálními látkami, a to jejich obecnou charakteristikou, jejich mechanismem účinku a stejně tak i přítomností u jednotlivých organismů, zejména bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum L.*), kterému je věnována největší část práce.

Experimentální část práce se zabývá některými metodami hodnocení antimikrobiální aktivity účinných látek (vybrané proteiny, peptidy hlíz brambor, komerčně dostupná antibiotika) vůči bakteriálním patogenům *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Vzhledem k rozsahu práce je pozornost soustředěna na 3 metody, jejichž optimalizace je stěžejní pro zavedení standardizovaného postupu hodnocení antimikrobiální aktivity hlízových proteinů. Z tohoto důvodu byly optimalizovány metody stanovení titru bakterií pomocí McFarlandových standardů a stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody. Vlastní hodnocení antimikrobiální aktivity bylo uskutečněno s využitím tzv. resazurinového testu.

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Rostlina a stresové reakce

Vzhledem k přisedlému způsobu života rostlin je problematika stresu u rostlin mnohem komplikovanější než ve fyziologii živočichů, protože rostliny nemohou uniknout před působením stresorů a je zde i mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv). Průnik stresových faktorů, ať už fyzikálně-chemických či biotických, do vnitřního prostředí rostlin různých druhů se uskutečňuje nesterjně snadno, především důsledkem různě vyvinutých ochranných struktur jako je kutikula na listech nebo výrazná impregnace buněčných stěn (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru, který je často omezen jen na část rostliny (listy nebo kořeny), dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (poplachová fáze). V případě, že intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů (restituční fáze), jejichž cílem je zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (fáze rezistence). Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídána dalším poklesem odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (fáze vyčerpání). Lokální stresová reakce může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostáze i za dlouhodobého působení stresorů je dosaženo často jen za cenu jistých dodatečných energetických nákladů, především na syntézu specifických metabolitů (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Zda dojde k infekci po inokulaci potencionálním infekčním agens, záleží ale na mnoha okolnostech. Rozhodujícími faktory jsou především infektibilita rostliny (stav rostliny, který ji uzpůsobuje k tomu, aby byla infikovatelná určitým infekčním agens) a infekčnost mikroorganismu (KŮDELA *et al.* 1989).

1.1.1. Kontakt rostliny s fytopatogenem

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořili v průběhu evoluce vzájemné spletené vztahy. Existují páry (rostlina – fytopatogen), kde náchylnost a rezistence jsou silně závislé na vnějších podmínkách prostředí, a nebo vnější podmínky prostředí až na extrémní případy nemají vliv na výsledek těchto interakcí. Obranná reakce rostlin není centralizovaným systémem k rozpoznání a eliminaci potencionálních patogenů. Jedná se o lokalizovanou reakci na infekci, která je určována reakcemi několika buněk bezprostředně po kontaktu rostliny a fytopatogena (KŮDELA *et al.* 1989).

Penetrace a počáteční vývoj patogena se v rezistentních a náchylných pletivech podstatně neliší. Fytopatogen je rozpoznán rostlinou jako „cizí“ a obranný systém rostliny aktivuje existující nebo nově vytvořené cesty vedoucí k rezistenci. Chemické signály patogena se nazývají elicitory (KŮDELA *et al.* 1989) a jsou uvolňovány při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovány vhodným receptorem hostitelské buňky (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Elicitory často ovlivňují nepřímo genovou aktivitu pomocí přenašečů signálu, tzv. druhý posel. Elicitory mohou být jednak některé metabolity vylučované patogeny (exogenní elicitory, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy), sloučeniny uvolňující se z narušovaných buněčných stěn obou organismů (endogenní elicitory, např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky) (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Poškození rostliny nemusí být přímo úměrné koncentraci patogena v hostitelských pletivech. Invaze patogena v rostlině vede k narušení normálních fyziologických procesů, důsledkem toho je onemocnění rostliny. Projevem patogenních procesů v rostlině je vznik symptomů (viditelných příznaků nebo jinak zjištěných abnormalit vzniklých následkem choroby) (KŮDELA *et al.* 1989).

1.1.2. Metabolismus infikovaných rostlin

Vznik infekce a vývoj symptomů choroby je odrazem určitého pořadí metabolických pochodů započatých kontaktem hostitele a patogena. Toto pořadí metabolických pochodů je pro každou dvojici hostitel – patogen charakteristické. Napadení rostliny fytopatogenními mikroorganismy má za následek zatížení energetického metabolismu rostliny, který musí krýt zvýšenou energetickou potřebu (napadené i okolní buňky vynakládají zvýšenou energii na „normalizaci“ svých funkcí narušovaných patogenem) (KŮDELA *et al.* 1989).

Zvýšený metabolismus rostlinných buněk po napadení patogenem je spojený se změnami permeability buněčných membrán. V důsledku těchto změn v permeabilitě membrán, dochází také ke změnám v kompartmentaci látek, koncentraci substrátu, kofaktorů a stimulátorů, inhibitorů, atd. a výrazně roste aktivita enzymů účastnících se na katabolismu sacharidů, metabolismu aminokyselin, syntéze aromatických látek, oxidačně redukčních a hydrolytických procesech (KŮDELA *et al.* 1989).

Produktem translačního procesu jsou bílkoviny. Kvalitativní i kvantitativní změny bílkovin, resp. enzymů, jsou projevem činnosti genů, řídících metabolickou aktivitu buňky za různých podmínek (vliv prostředí, poranění, infekce, atd.) (KŮDELA *et al.* 1989).

1.1.3. Chemické sloučeniny mající podíl na obranných reakcích rostliny

Vlastní obranná reakce zahrnuje tvorbu specifických stresových proteinů a syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem (fytonciny neboli inhibitory), kterými jsou např. flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy. (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

1.1.3.1. Fytoalexiny

Fytoalexiny se začínají tvořit v buňkách rostliny až po napadení patogenem. V současné době je známo více než 300 fytoalexinů, patřící mezi velmi různorodé typy sloučenin. Fytoalexiny mají vysoce toxické účinky již v koncentracích 10^{-6} až 10^{-5} mol/l především na patogenní houby, méně pak na bakterie (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Obrannou reakcí rostlin je také rychlé zvýšení tvorby polysacharidu kalózy (1,3-D-glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů. Úspěšnost silně virulentních kmenů hub spočívá jednak v mimořádně rychlém růstu hyf, jednak v tvorbě specifických látek (supresorů), které potlačují tvorbu stresových proteinů a ostatních ochranných metabolitů. (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

1.1.3.2. Růstové látky indolového typu

U bakteriálních chorob byl zaznamenán výrazný nárůst koncentrace kyseliny indolyl-3-octové (angl. *Indole Acetic Acid* – IAA) v infikovaných pletivech, např. u tabáku infikovaného bakteriemi *Pseudomonas solanacearum*, kde koncentrace IAA v infikovaných pletivech vzroste až stonásobně. Předpokládá se tedy, že koncentrace IAA v pletivech infikovaných rostlin má důležitou úlohu při mobilizaci a transportu metabolitů potřebných pro růst a vývoj parazita. Často se také stává, že IAA je produkována samotným parazitem. Často silná aktivace metabolismu rostliny v morbidní fázi choroby je doprovázena zvýšeným obsahem IAA. To následně vedlo k formulaci hypotézy, že zvýšená koncentrace IAA v infikovaných rostlinných pletivech zvyšuje náchylnost, zatímco, zvýšené odbourávání IAA, jakož i antiauxiny zvyšují rezistenci k fytopatogenním houbám (KŮDELA *et al.* 1989).

1.1.3.3. Inhibitory enzymů vylučovaných patogeny

Mnohé fytopatogenní houby a bakterie vylučují do hostitelských pletiv různé hydrolytické enzymy, které často difundují do míst, kam samotný patogen ještě nepronikl. Tyto enzymy štěpí makromolekulární složky hostitelských buněk na nízkomolekulární deriváty a narušují tak buněčné membrány. Předpokládá se, že hydrolytické enzymy jsou důležité pro zabezpečení nutričních potřeb patogena (KÚDELA *et al.* 1989).

K inhibitorům enzymů patří fenolické sloučeniny a taniny. Volné radikály oxidovaných enzymů působí jako nespecifické inhibitory celé řady enzymů. Menší pozornost se dosud věnovala inhibitorům proteinové povahy. Protein fungující jako inhibitor je schopen totálně a selektivně inhibovat polygalakturonázy různých hub a přitom ostatní glykosidázy neovlivňovat (KÚDELA *et al.* 1989; HEITEFUSS, WILLIAMS 1976; HORSFALL, COWLING 1980).

1.1.3.4. Enzymy lyzující patogeny

Enzymy lyzující patogeny (hydrolyzované lysozomální enzymy) si rostlina uchovává ve zvláštních vakuolách v cytoplazmě, tzv. lysozomech či sférozomech. Tyto enzymy se v průběhu patogeneze uvolňují do cytoplazmy a mezibuněčných prostor (KÚDELA *et al.* 1989; HORSFALL, COWLING 1980). Předpokládá se, že lysozomální enzymy se mohou podílet na hypersenzitivních reakcích, které mají úlohu v rezistenci rostlin (KÚDELA *et al.* 1989).

β -(1,3) - glukanáza a chitináza lyzuje glukanové a chitinové složky nemelanizovaných buněčných stěn houbových patogenů. To může mít někdy za následek ozdravení infikovaných rostlin (KÚDELA *et al.* 1989; HORSFALL, COWLING 1980).

Rostliny produkují také proteolytické enzymy, které by se mohly podílet na inaktivaci virů. Proteázy schopné degradovat proteinový obal X-viru bramboru byly zjištěny např. v surové rostlinné šťávě (KÚDELA *et al.* 1989)

1.1.3.5. Proteiny indukované patogeny

Proteiny indukované patogeny (angl. *Pathogenesis-related proteins – PR proteins*) tvoří početnou a různorodou skupinu, která je dále dělena na podskupiny podle velikosti a podle převažujících funkcí. V této skupině se nacházejí i proteiny se specifickými antimikrobiálními účinky. Těmi jsou zejména enzymy chitináza a glukanáza, které jsou schopny hydrolyzovat buněčnou stěnu patogenů a přitom produkovat elicitory dalších obranných reakcí. Fungicidní účinky mají proteiny, které inaktivují ribozomy. Zvláštní

skupinou obranných proteinů jsou tioniny. Tioniny lze nalézt velmi rychle po kontaktu buňky s patogenem v buněčné stěně, protože působí na široké spektrum patogenů, pravděpodobně tím, že vytváří póry v jejich membránách (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

1.2. Antimikrobiální proteiny

1.2.1. Obecná charakteristika antimikrobiálních proteinů

Antimikrobiální proteiny a peptidy (angl. *Antimicrobial Proteins*; AMPs) rostlin jsou specifické stresové proteiny, které mají schopnost omezovat až zcela inhibovat růst mikroorganismů (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; NEUBAUEROVÁ *et al.* 2009). Většina AMPs byla identifikována jako peptidy o malé až velmi malé molekulové hmotnosti, s bohatým zastoupením cysteinu ve své struktuře (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; BROEKAERT *et al.* 1997). Jsou to malé, geny kódované proteiny mající široké spektrum aktivity vůči gramnegativním a grampozitivním bakteriím, houbám a mykobakteriím (JIN *et al.* 2008; ZASLOFF 2002) a protozoím (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011). Všechny antimikrobiální proteiny mají schopnost tvořit amfipatickou nebo amfifilní konformaci, která je charakteristická periodicky se opakujícími úseky, ve kterých se střídají hydrofobní a hydrofilní domény. Schopnost zaujímat amfipatickou konformaci je často indukována interakcí s cytoplazmatickou membránou (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; ROTEM & MOR 2009). Téměř všechny antimikrobiální proteiny tvoří při vazbě na membránu amfipatické struktury, často α -helix (NEUBAUEROVÁ *et al.* 2009; BULET *et al.* 2004).

Skupina antimikrobiálních proteinů zahrnuje přes 1 000 zástupců a jsou složkou první obranné linie proti infekčním mikroorganismům (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; BECHINGER & LOHNER 2006). Mimo proteinů izolovaných z přírodních zdrojů bylo syntetizováno několik tisíc syntetických variant (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; BLONDELLE & LOHNER 2000).

1.2.2. Mechanismus účinku a působení antimikrobiálních proteinů

Existuje velké množství antimikrobiálních látek a také několik mechanismů účinku, avšak vždy působí nějakým způsobem na změnu v syntéze makromolekul buňky. Mechanismy účinku jsou založeny na změnách v syntéze bílkovin, syntéze nukleových kyselin, syntéze buněčné stěny, inhibici metabolických drah nebo alteraci selektivní permeability buněčné membrány. Vzhledem k tomu, že tyto změny jsou do určité míry omezené, je zde vysoké riziko rezistence vůči látkám je způsobující, tedy antibiotika, což je velkým problémem současnosti (BEDNÁŘ *et al.* 1996).

K působení antimikrobiálních proteinů je zapotřebí jejich přiblížení a interakce s membránou buňky. Příčinou migrace antimikrobiálních proteinů k membráně buňky jsou elektrostatické interakce a membránový potenciál. Poté může nastat několik možností

narušení buněčné membrány, jako je fatální depolarizace membrány, vytváření selektivních kanálů se ztrátou buněčného obsahu, aktivace destrukčních procesů buňky (aktivace hydroláz buněčné stěny, narušení funkce membrány translokací lipidů (NEUBAUEROVÁ *et al.* 2009). Po narušení membrány buněčné stěny může dojít k průniku některých proteinů až k intramolekulárnímu cíli (NEUBAUEROVÁ *et al.* 2009; ZASLOFF 2002).

Všechny antimikrobiální proteiny interagují s membránami a lze je rozdělit do dvou skupin (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011):

- 1) Proteiny rozkládající membránu
- 2) Ostatní

Mechanismus účinku zodpovědný za usmrcení bakterií a minimální efektivní koncentrace se liší u různých proteinů i bakterií (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; FRIEDRICH *et al.* 2000).

1.2.3. Mechanismus působení u gramnegativních bakterií

Mechanismus působení u gramnegativních bakterií je zatím nejlépe popsán. Interakce proteinu s bakteriální membránou spočívá v elektrostatických interakcích mezi kationickým proteinem a anionickou vrstvou lipidů ve vnější vrstvě membrány, což vede k rozrušení membrány. Kationické proteiny mají větší afinitu k lipopolysacharidům (LPS) ve vnější vrstvě membrány gramnegativních bakterií než k přítomným dvoumocným kationtům Mg^{2+} a Ca^{2+} (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; HANCOCK & CHAPPLE 1999). Kationické proteiny vytlačí tyto kationty od negativně nabitých LPS, což má za následek lokální destabilizaci ve vnější membráně. To podporuje tvorbu destabilizovaných oblastí, přes které se protein dostane vnější membránou, v procesu označovaném jako „vnesení“ do buňky podporované samotným peptidem (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; EPAND & VOGEL 1999). Následně je možný přístup k cytoplazmatické membráně a proteiny interagují s vnější vrstvou cytoplazmatické membrány (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011).

1.2.4. Porušení buněčné membrány

K narušení integrity buněčné membrány dochází zejména proteiny ze skupiny α -helikálních proteinů. Vznik iontově selektivních kanálů může způsobit ztrátu transmembránového potenciálu s následnou ztrátou energetické funkce biomembrány. Většími „dírami“ v membráně může buňka ztratit životně důležité látky a následkem je její zánik (NEUBAUEROVÁ *et al.* 2009), který u nejaktivnějších peptidů nastává do 5 minut (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; FRIEDRICH *et al.* 1999).

Některé kationické antimikrobiální peptidy inhibovaly replikaci obalených virů (virus chřipky A, virus vestibulární stomatitidy a virus lidské imunodeficiency (HIV-1). Kationické peptidy mohou vykazovat protirakovinovou aktivitu nebo podporovat hojení (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011), působí také jako efekторы vnitřní imunitní odpovědi (DOLEŽÍLKOVÁ *et al.* 2011; YEAMAN & YOUNT *et al.* 2003).

1.2.5. Výskyt antimikrobiálních proteinů

U mnohobuněčných organismů se antimikrobiální proteiny nazývají eukaryociny a jsou velmi specifické svým působením. Eukaryociny byly objeveny prakticky u každého mnohobuněčného organismu (LORENC 2011; SHAND & LEYVA 2008).

1.2.5.1. Výskyt antimikrobiálních proteinů u hub

Houby se ve svém přírodním prostředí musí bránit působení mikroorganismů. Obsahují proto antimikrobiální látky různé účinnosti (KALÁČ 2008). Majoritními houbami, co se antimikrobiální aktivity týče, jsou houby vláknité, rodu *Penicillium*, konkrétně *Penicillium notatum*, ze kterého poprvé Alexander Fleming v roce 1939 vyizoloval penicilin, dnes známé antibiotikum. Je zde snaha o rozsáhlejší výzkum antimikrobiálních látek hub a jejich využití.

Z méně známých hub (KALÁČ 2008) uvádí např. houbu lesklokorku lesklou, u jejíž několika látek byla ověřena její účinnost vůči virům vyvolávajícím chřipku typu A, opary či AIDS. Také fenolové složky hub, významné antioxidanty dokážou potlačit některé zdravotně problematické bakterie. Z evropských druhů hub to bylo prokázáno u ryzce pravého, lošáku jeleního a čirůvky havelky (KALÁČ 2008; BARROS *et al.*, 2007).

1.2.5.2. Výskyt antimikrobiálních proteinů u živočichů

Živočichové jsou denně vystavováni velkému množství potencionálních patogenů. Nakazit se mohou přímým kontaktem, přijímáním potravy nebo inhalací. Schopnost ubránit se infekci závisí na vrozených mechanismech imunitní obrany, tedy i na působení antimikrobiálních peptidů (LORENC 2011, HANCOCK & SCOTT 2000).

Tab. 1: Vybrané antimikrobiální proteiny a jejich zastoupení u živočichů

Prevzato z LORENC (2011); upraveno podle ANDREU & RIVAS (1998)

Název peptidu	Výskyt
Andropin	Octomilka (<i>Drosophila melanogaster</i>)
Bombolitin	Čmelák (<i>Megabombus pensilvanicus</i>)
Cecropin PI	Prase (<i>Sus scrofa</i>)
CRAMP	Myš (<i>Mus musculus</i>)
FALL-39	Člověk (<i>Homo sapiens</i>)
Misgurin	Piskoř (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)
Seminalplasmin	Skot (<i>Bos taurus</i>)
Prophenin	Prase (<i>Sus scrofa</i>)
Lebocin I	Bourec (<i>Bombyx mori</i>)
Esculentin	Skokan (<i>Rana esculenta</i>)
Thanatin	Ploštice (<i>Podisus maculiventris</i>)
Styelin	Sumka (<i>Styela clava</i>)
Magainin I	Drápatka (<i>Xenopus laevis</i>)

1.2.5.3. Výskyt antimikrobiálních proteinů u rostlin

Rostliny produkují několik typů proteinů zprostředkávajících obranu rostlin vůči patogenům (JIN *et al.* 2008; YE *et al.* 1999; POUVREAU *et al.* 2003). Nejrozšířenějšími jsou fenolické látky (aromatické aminokyseliny, ligniny, lignany, flavonoidy a fenolické glykosidy), saponiny, nenasycené laktony a sírné sloučeniny. Mnohé z nich se v rostlinách vyskytují ve zdravém a inaktivním stavu. Tyto látky se aktivují různými hydrolytickými nebo oxidačními reakcemi po poškození membrán buněčných organel a následné dekompartmentaci (PROCHÁZKA *et al.* 1998).

Tyto antimikrobiální proteiny byly zjištěny u velkého množství druhů zemědělských plodin a jsou důvodem rezistence některých rostlin k onemocnění způsobeným mikroorganismy. V rostlině, v průběhu napadení rostliny patogenem jsou antimikrobiální proteiny ve velké míře exprimovány, jak lokálně, tak systematicky v celé rostlině. V důsledku toho se předpokládá jejich úloha v obranném mechanismu rostliny (KIM *et al.* 2009; GLAZEBROOK 1999).

1.3. Vybrané antimikrobiální proteiny rostlin

1.3.1. Napiny

Napiny (angl. *napins*) jsou 1:1 disulfidy spojené komplexy s menší (cca 4 kDa) podjednotkou a větší (cca 10 kDa) podjednotkou. Heterodimerický 11 kDa polypeptid podobný napinu byl izolován ze semen bílého čínského zelí (*Brassica chinensis* cv. *Dwarf*). U napinu byla nalezena antimikrobiální aktivita vůči (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus megaterium* (KIM *et al.* 2009; NGAI & NG 2004).

1.3.2. Proteiny přenosu lipidů

Proteiny přenosu lipidů (angl. *lipid-transfer proteins – LTPs*) jsou velké 8-9 kDa a zajišťují přenos fosfolipidů mezi membránami. Proteiny jsou stabilizovány čtyřmi disulfidickými můstky a vytvářejí centrální dutinu v podobě jakéhosi tunelu. Proteiny jsou aktivní vůči řadě bakterií a hub. Mechanismus účinku není znám (HEŘMANOVÁ *et al.* 2006; PARK *et al.* 2002). Hypotézy tvrdí, že LTPs mají schopnost začlenit se do buněčné membrány hub tak, že centrální hydrofobní dutina vytvoří póry, které umožní odliv intracelulárních iontů, což v konečném důsledku způsobí smrt buňky. Vztah mezi tímto účinkem a funkcí přenosu lipidů není objasněný (HEŘMANOVÁ *et al.* 2006; SELITRENNIKOFF 2001). Tento protein byl izolován např. z ječmene (KIM *et al.* 2009).

1.4. Proteiny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

1.4.1. Obecná charakteristika bílkovin hlíz *Solanum tuberosum* L.

Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) jsou dnes intenzivně zkoumány na přítomnost antimikrobiálních látek bílkovinné povahy. Majoritním proteinem hlíz brambor s antimikrobiální aktivitou je patatin (BÁRTA & ČURN 2004).

Hlíza bramboru obsahuje v průměru něco kolem 1 % bílkovin v čerstvé hmotě. V sušině to činí objem kolem 4,5 %. Ze skupiny dusíkatých látek, které hlíza bramboru obsahuje, představují z nich asi 50 % bílkoviny a dalších 50 % připadá na dusíkaté látky nebílkovinné povahy (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007). Při 50 % zastoupení v obsahu celkových dusíkatých látek jsou nebílkovinné dusíkaté látky členěny na volné aminokyseliny (15 %), amidy asparagin a glutamin (23 %) a ostatní dusíkaté látky (12 %) (BÁRTA & ČURN 2004).

Zastoupení bílkovin se liší hlavně v závislosti na genotypu bramboru a abiotických podmínkách prostředí (BÁRTA & ČURN 2004). Vliv má také velikost hlízy. Čím je menší, tím vyšší je obsah dusíkatých látek (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

1.4.2. Klasifikace hlízové bílkoviny *Solanum tuberosum* L.

Existuje mnoho názorů na rozdělení hlízových bílkovin bramboru. Staršími technikami se často dělily podle rozpustnosti na jednotlivé frakce – albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou (BÁRTA & ČURN 2004). Například BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007) uvádějí, že globulinové frakce tvořené proteinem tuberinem tvoří asi 70 %, zatímco frakce albuminové zastoupené tuberininem kolem 30%. Jiní autoři se domnívají, že je zastoupení jiné. BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007); LINDNER *et al.*(1960) uvádějí, že zastoupení albuminů je 50 %, globulinů 26 % a zbytek se zastoupením 22 % je tvořen prolaminovými a glutelinovými frakcemi. BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007) a SEIBLES (1979) uvádějí zastoupení albuminové frakce 75 % a frakce globulinové 25 %.

Koncem šedesátých let začaly být preferované elektroforetické a chromatografické techniky, které umožňují třídění molekul na základě jejich molekulové hmotnosti. Na základě toho člení BÁRTA & ČURN (2004) hlízové bílkoviny na tři hlavní skupiny:

- 1) patatin neboli patatinový komplex či rodina patatinových bílkovin
- 2) bramborové inhibitory proteáz
- 3) ostatní bílkoviny, hlavně bílkoviny s enzymovou účastí na syntéze škrobu

1.4.3. Patatinový komplex

1.4.3.1. Obecná charakteristika patatinového komplexu

Patatin je triviální označení, kterým byla tato bílkovina nazvána v roce 1980, kdy byla skupina (rodina) patatinových bílkovin poprvé izolována pomocí iontovýmenné a afinitní chromatografie (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; RACUSEN & FOOTE 1980). Izolace a částečná charakterizace patatinových bílkovin proběhla již dříve (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; GALLIARD 1971; DENNIS & GALLIARD 1974), avšak bez zařazení zkoumaných enzymů k bílkovinám patatinového komplexu (BÁRTA & BÁRTOVÁ, 2007). Starší publikace představují patatinový komplex jako skupinu imunologicky shodných glykoproteinů s původně zjištěnou molekulovou hmotností v rozsahu od 40 000 do 45 000 Da a prokázanou lipid acyl hydrolázovou aktivitou (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; DENNIS & GALLIARD 1974; LEE *et al.* 1983). Později se zjistilo, že patatin je zřejmě „in vivo“ syntetizován jako „větší“ prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa a následně „upravován“ odštěpením signálního peptidu tvořeného 23 aminokyselinami (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; MIGNERY *et al.* 1984). Novější publikace uvádějí molekulovou hmotnost těchto bílkovin v rozmezí 40 - 43 kDa (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; ROSAHL *et al.* 1986; POTS 1999). Hodnota isoelektrického bodu bílkovin patatinového komplexu je v rozmezí pH 4,6 až 5,2 (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POTS 1999). V nativním stavu je patatin cylindrického tvaru o průměru 5 nm a délce 9,8 nm (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POTS 1999).

Bílkoviny patatinového komplexu tvoří 20 – 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; MACRAE *et al.* 1998), BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007); POTS (1999) uvádějí podíl rozpustných bílkovin bramborových hlíz až 60 %.

1.4.3.2. Úloha patatinu v *Solanum tuberosum* L.

Patatin se vyskytuje v hlízách brambor, kde je lokalizován v centrálních vakuolách parenchymatických buněk (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; SONNEWALD *et al.* 1989). V hlízách bramboru je patatin vysoce zastoupen (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; ROSAHL *et al.* 1986) a vzhledem ke specifické enzymatické aktivitě bílkovin patatinového komplexu byla vyslovena hypotéza, že zásobní funkce není jedinou funkcí této bílkoviny (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; SENDA *et al.* 1996; TONÓN *et al.* 2001; PEYER *et al.* 2004; BÁRTA & ČURN 2004). Teorie zásobní funkce patatinu je podpořena i faktem, že pokud hlízy bramboru déle skladujeme, snižuje se obsah patatinových bílkovin. To samé se děje i následkem klíčení (BÁRTA & ČURN 2004).

Hromadění patatinu v rostlině nastává jen za určitých podmínek. Je ovlivněno fotoperiodou, kdy je pro tvorbu patatinu potřeba konkrétních podmínek, které jsou například přítomny při samotném vzniku hlízy. Jeho hromadění v rostlinných částech (hlízy, stonek, listy) je také potlačováno přítomností kyseliny gibberelové. Patatin můžeme nalézt i v kořenech rostliny, avšak asi ve stonásobně nižší koncentraci než v hlízách (BANSAL 2005).

U patatinu byla zjištěna antioxidační a antiradikálová aktivita (KIM *et al.* 2009; LIU *et al.* 2003).

1.4.3.3. Enzymová aktivita bílkovin patatinového komplexu

U patatinu byla zjištěna tato enzymová aktivita:

1) Aktivita nescifické lipidacylhydrolázy (LAH aktivita; EC 3.1.1)

U proteinu byla nalezena aktivita nescifické lipidacylhydrolázy (LAH), neboli esterázová aktivita pro tvorbu voskových esterů i pro deacylaci lipidů (BÁRTA & ČURN 2004; RACUSEN *et al.* 1984; RACUSEN *et al.* 1986). Protein se vyznačuje vysokou aktivitou vůči fosfolipidům, monoacylglycerolům nebo p-nitrofenylovým esterům karboxylových kyselin (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007). Střední aktivitu vykazuje vůči galaktolipidům a žádnou vůči di-acyl a tri-acyl glycerolům (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; ANDREWS *et al.* 1988). To naznačuje možné zapojení patatinu v obranném mechanismu rostliny proti patogenům, což bylo podpořeno i zkouškami s biologickým materiálem (HANUSOVÁ & ČURN 2006).

Předpokládá se, že odrůdy s nízkou LAH aktivitou budou méně odolné vůči patogenům než odrůdy s aktivitou LAH vyšší (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

Fyziologická funkce LAH aktivity v obraně hlízy vůči patogenům zahrnuje 2 možné teorie působení:

- a) Jako následek poškození buněčné stavby rostliny se v důsledku LAH aktivity patatinu uvolňují mastné kyseliny, které jsou následně oxidovány lipooxidázami. Následkem toho vznikají cytotoxicky oxidované mastné kyseliny (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POTS *et al.* 1999).
- b) Druhá hypotéza je, že LAH aktivita patatinu působí na patogena inhibičně přímo a narušuje tak jeho integritu buněčné stěny (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; STRICKLAND *et al.* 1995).

Ani jedna z teorií však nebyla přímo potvrzena (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

2) Aktivita cytosolové fosfolipázy A₂ a A₁ (PLA₂; PLA₁ aktivita; EC 3.1.1.4)

Podle (BÁRTA & ČURN 2004) někteří autoři (SENDA *et al.* 1996, HIRSCHBERG *et al.* 2001) došli k závěru, že cytosolová fosfolipáza A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4), katalyzující hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů má stejné vlastnosti (molekulová hmotnost 40 kDa, *pI* 4,75 a vysoká homologie N-koncové sekvence polypeptidového řetězce) jako patatin, a považují tak hlízový enzym s PLA aktivitou za patatin. Tento enzym (patatin) má aktivitu fosfolipázy A₁ (PLA₁) i A₂ (PLA₂), přičemž aktivita A₂ je vyšší (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

Výrazná PLA₂ aktivita byla zaznamenána zvláště při použití substrátu fosfatidylcholinu s linolovou kyselinou navázanou v pozici *sn*-2. Nižší aktivita enzymu byla zaznamenána při použití substrátu fosfatidylcholinu s kyselinou palmitovou, olejovou nebo arachidonovou, které byly navázané v pozici *sn*-2. Byla také zjištěna závislost aktivity PLA₂ na pH prostředí. Nejvyšší aktivita PLA₂ byla zjištěna v rozsahu hodnot pH 7,5 až 9,0. Při poklesu hodnoty pH pod 7,0 byla aktivita PLA₂ minimální. Aktivitu fosfolipázy A₂ ovlivňuje více faktorů, nejdůležitějšími z nich je pH a lokalizace enzymu v rostlině. Téměř žádná nebo minimální aktivita byla zjištěna u hodnot pH pod 7, což je zejména v rostlinných vakuolách, zatímco nejvyšší aktivita byla mezi pH 7,5 - 9, tedy zásaditém prostředí např. cytosolu, kam je enzym poslán v případě napadení rostliny patogenem. Aktivita patatinu je také podněcována přítomností Ca²⁺ a vlivem proteinu kinázy (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

Zvýšení PLA₂ v infikovaných listech, kterému předchází nahromadění obranných signálů odvozených od mastných kyselin, naznačuje, že právě PLA₂ spouští syntézu těchto signálů uvolňováním mastných kyselin z membránových lipidů (HANUSOVÁ & ČURN 2006; SHEWRY 2003). Fosfolipáza A₂ má účast na signální transdukcii, která vyvolává rezistentní reakci v bramborových buňkách při inokulaci inkompatibilní rasou houbového patogena *Phytophthora infestans* nebo při kontaktu s elicitorem komponent stěn hyf tohoto patogena (BÁRTA & ČURN 2004; SENDA *et al.* 1998). Je také zaznamenán inhibiční efekt na růst larev brouků rodu *Diabrotica* fosfolipázou A₂ krmnými, který je vysvětlován cytotoxickou oxidací mastných kyselin hydrolyzovaných patatinem (BÁRTA & ČURN 2004; STRICKLAND *et al.* 1995).

1) Aktivita β -1,2 – xylosidázy (EC 3.2.1.37)

Bílkovina s aktivitou β -1,2 – xylosidázy má molekulovou hmotnost 39 – 40 kDa, hodnotu *pI* 5,1 a optimální pH pro její aktivitu je od 4 – 4,5 a teplota 50°C. N-terminální sekvence aminokyseliny vykazuje vysoký stupeň homogenity stejně jako proteiny patatinového komplexu. Tento protein byl opět identifikován jako patatin. β -1,2-xylosidáza má zřejmě mimo jiné i vliv na obranný systém hlízy bramboru. Na β -1,4 vazby vykazuje velké množství xylosidáz hydrolytickou aktivitu (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

2) Aktivita kyselá β -1,3-glukanázy (GLU-40; EC 3.2.1.39)

Kyselá β -1,3-glukanáza má molekulovou hmotnost 40 kDa, hodnotu *pI* 4 - 4,5 a vysoký stupeň homogenity N-terminální sekvence aminokyselin s bílkovinami patatinového komplexu. Protein můžeme tedy opět označit za patatin (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

Aktivita kyselá β -1,3-glukanázy obecně přispívá k obraně rostlin proti houbovým patogenům hydrolýzou β -1,3-glukanů buněčných stěn hyf (BÁRTA & ČURN 2004; SHEWRY *et al.* 1997) a společně s chitinázami degradují buněčné stěny hub, které jsou složené ve většině případů z chitinu a β -1,3-glukanáz, vážou se na ně, a tím tedy potlačují nebo zastavují jejich růst (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007).

1.4.4. Inhibitory proteáz

1.4.4.1. Obecná charakteristika inhibitorů proteáz

Inhibitory proteáz představují jednu ze tří skupin rozpustného proteinu v hlíze bramboru, další dvě skupiny zahrnují již zmíněný patatin a skupinu ostatních proteinů (HANUSOVÁ & ČURN 2006; POUVREAU, *et al.* 2001).

1.4.4.2. Úloha inhibitorů proteáz v *Solanum tuberosum* L.

Inhibitory proteáz mohou v rostlinách zaujímat celou řadu odlišných rolí. Mohou působit jako zásobní proteiny, regulátory endogenní proteolytické aktivity (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RYAN 1990) i jako součást mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti (HANUSOVÁ & ČURN 2006; HASS *et al.* 1976). Úlohou inhibitorů proteáz je kontrola proteolýzy, která je klíčovým procesem všech žijících organismů, a je proto důležitá její přísná kontrola (HANUSOVÁ & ČURN 2006; HRAŠKA *et al.* 2006).

V rostlině představuje nejdůležitější oblast činnosti inhibitorů proteáz jejich zapojení do obranného mechanismu rostliny. Hlízové inhibitory proteáz Kunitzova typu patří k nejvýznamnější skupině, co se antimikrobiální aktivity inhibitorů proteáz hlíz brambor týče

(BÁRTOVÁ *et al.* 2012). K nárůstu zastoupení inhibitorů proteáz dochází v odpovědi na mechanické poranění nebo napadení patogenem. Nárůst může být pozorován v okolí poranění (lokální) a také v celé rostlině (systematický). Lze tedy odvodit možné zapojení inhibitorů proteáz v obranném mechanismu rostliny (HANUSOVÁ & ČURN 2006; LAWRENCE & KOUNDAL 2002).

Většina inhibitorů proteáz zapojených do obranného mechanismu rostliny jsou serinové proteázy, méně častěji pak také cysteinové proteázy (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RYAN 1990). O působení zbývajících dvou tříd inhibitorů proteáz (inhibitory aspartátových proteáz a inhibitory metalloproteáz) v obranných mechanismech rostliny existuje pouze málo informací (HANUSOVÁ & ČURN 2006; WU & HAARD *et al.* 2000).

1.4.4.3. Zastoupení inhibitorů proteáz v *Solanum tuberosum* L.

Bylo popsáno, že inhibitory proteáz tvoří kolem 30 % celkového proteinu hlíz brambor (HANUSOVÁ & ČURN 2006; MELVILLE & RYAN 1972), přesný poměr jejich zastoupení není objasněn (HANUSOVÁ & ČURN 2006). Nejvyšší zastoupení inhibitoru proteáz proto nalezneme v zásobních orgánech, jako jsou hlízy bramboru (*Solanum tuberosum* L.). S jejich syntézou se však můžeme setkat i v dalších rostlinných orgánech, především v listech. Jejich syntéza je vyvolána poškozením rostlinné tkáně dané rostliny, s předpokladem, že za tímto poškozením stojí nějaký rostlinný patogen (BÁRTA & ČURN 2004).

1.4.4.4. Klasifikace inhibitorů proteáz hlíz *Solanum tuberosum* L.

Jedná se o mnohem více heterogenní skupinu proteinů v porovnání s patatinem. Jednotlivé inhibitory proteáz se navzájem liší svou molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením, *pI*, a také inhibiční aktivitou (HANUSOVÁ & ČURN 2006; POUVREAU *et al.* 2001).

Dělení inhibitorů hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.) do podtříd se liší podle jednotlivých autorů. Přirozeně se vyskytující inhibitory proteáz jsou primárně klasifikovány na základě typu, popř. typu enzymů, které inhibují (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RYAN 1990). Proteázy samotné jsou většinou klasifikovány podle aminokyselinového zbytku ve svém aktivním místě (HANUSOVÁ & ČURN 2006). Dělení inhibitorů proteáz do 3 tříd a skupin podle (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RICHARDSON 1991) je následující:

- 1) **Bramborový inhibitor I (PI-1):** jedná se o inhibitor serinových proteáz, pentamer, složený z isoinhibitorových promotorových podjednotek s celkovou

molekulovou hmotností 40 kDa (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RICHARDSON 1974).

- 2) **Bramborový inhibitor II (PI-2):** jedná se o skupinu tvořenou dimery inhibitorů serinových proteáz, kdy jsou obě podjednotky spojeny disulfidovými můstky na N-konci. Protein se chová jako jednodoménový protein (HANUSOVÁ & ČURN 2006; LEE *et al.* 1999).
- 3) **Proteiny o molekulové hmotnosti 20 až 22 kDa:** liší se typem proteázy, kterou inhibují a počtem cysteinových zbytků na podjednotku, dělené následně do těchto podtříd:
 - a) Inhibitory proteáz Kunitzova typu (HANUSOVÁ & ČURN 2006; WALSH *et al.* 1991)
 - b) Inhibitory cysteinových proteáz (HANUSOVÁ & ČURN 2006; KRIZAJ *et al.* 1993)
 - c) Inhibitory aspartátových proteáz (HANUSOVÁ & ČURN 2006; RITONJA *et al.* 1990)
 - d) Inhibitor karboxypeptidázy (HANUSOVÁ & ČURN 2006; HASS *et al.* 1976)

Jiné dělení je založené na typu enzymu, který je inhibitorem inhibován na serinové (serin či histidin v aktivním místě proteázy), cysteinové (cystein v aktivním místě proteázy), aspartátové (aspartátová skupina v aktivním místě proteázy) nebo metalloproteázové (s kovovým iontem v aktivním místě proteázy) inhibitory proteáz (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; JONGSMA 1995).

Dělení inhibitorů do skupin může být komplikováno i strukturou aktivního místa, proto mohou být inhibovány dvě odlišné proteázy (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007). Tzv. „*double-headed*“ inhibitory proteáz, mají ve struktuře 2 odlišná aktivní místa, a proto mohou inhibovat 2 odlišné enzymy. Druhým typem jsou „*single-headed*“ inhibitory proteáz s jedním aktivním místem. Tento jev se ale při klasifikaci nebere v úvahu. Inhibitory proteáz stejné skupiny mohou být tedy „*single-*“, i „*double-headed*“ (HANUSOVÁ & ČURN 2006). V některých případech je dělení inhibitorů proteáz do skupin komplikováno strukturou aktivního místa nebo homologii sekvencí. Inhibitory proteáz lze dělit také na základě jejich molekulové hmotnosti, stavbě proteinu (monomer či multimer), hodnotě isoelektrického bodu a počtu disulfidových můstků v molekule (HANUSOVÁ & ČURN 2006; POUVREAU *et al.*

2001). Inhibitory proteáz hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.) jsou děleny do tří (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POTS 1999) nebo sedmi (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001) skupin.

Dělení inhibitorů do sedmi skupin podle BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007); POUVREAU *et al.* (2001):

- 1) **Bramborový inhibitor I (PI-1; Potato Inhibitor I):** serinový inhibitor proteáz; 7,7 – 7,9 kDa velký; pentamer, hodnota isoelektrického bodu 5,1-7,8; existuje 8 forem této třídy (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001). Inhibovanými enzymy jsou chymotrypsin a trypsin (HANUSOVÁ & ČURN 2006).
- 2) **Bramborový inhibitor II (PI-2; Potato Inhibitor I):** serinový inhibitor proteáz; 10,2 kDa velký; dimer (podjednotky spojeny disulfidickými můstky); hodnota isoelektrického bodu 5,5 – 6,9; existuje 7 isoform; tvoří 22 % z celkových bílkovin (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001), Inhibovanými enzymy jsou trypsin a chymotrypsin (HANUSOVÁ & ČURN 2006).
- 3) **Bramborový cysteinový inhibitor (PCPI; Potato Cystein Protease Inhibitor):** 20,1 – 22,8 kDa velký; hodnota isoelektrického bodu 5,8 – 9; tvoří asi 12 % z celkových bílkovin, inhibitor cysteinových proteáz, trypsinu a chymotrypsinu (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001) a papainu (HANUSOVÁ & ČURN 2006).
- 4) **Bramborový aspartátový inhibitor (PAPI; Potato Aspartyl Protease Inhibitors):** 19,9 – 22 kDa velký; hodnota isoelektrického bodu 6,2 – 8,7; ve skupině 6 inhibitorů (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001). Inhibovanými enzymy jsou trypsin, chymotrypsin, cathepsinD (HANUSOVÁ & ČURN 2006). Do této skupiny patří také proteiny StAP1, StAP2 a StAP3. StAP1 byl izolován z hlízy (MENDIETA *et al.* 2006; GUEVARA *et al.* 1999), StAP2 a StAP3 z listů (MENDIETA *et al.* 2006; GUEVARA *et al.* 2001).
- 5) **Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu (PKPI; Potato Kunitz Protease Inhibitors):** 20,2 kDa velké, hodnota isoelektrického bodu 8 – 9, skupina obsahuje 2 zástupce (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001). Inhibovanými enzymy jsou trypsin a chymotrypsin (HANUSOVÁ & ČURN 2006) a u proteinu PSPI-21 i elastáza (BÁRTOVÁ *et al.* 2012;

REVINA *et al.* 2008). Protein PCPI-23 vykazuje aktivitu pouze vůči papainu (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; REVINA *et al.* 2008). Při napadení hlíz patogenem *P. infestans* byla zjištěna kumulace inhibitorů Kunitzova typu s označením PSPI-21, PSPI-22, PCPI-23 a PKSI (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; VALUEVA *et al.* 1998). Inhibitor PSPI-21 je tvořený dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa. Protein PKSI je tvořený jedním polypeptidovým řetězcem o velikosti 21 kDa a je aktivní vůči subtilisinu Carlsberg (BÁRTOVÁ *et al.*, REVINA *et al.* 2008). Proteiny PSPI-22 a PCPI-23 jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o hmotnosti 22 a 23 kDa (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; VALUEVA *et al.* 1998). U inhibitorů (PSPI-21, PSPI-22 a PKSI) byl zjištěn inhibiční vliv na růst hyf a klíčení zoospor patogena *P. infestans*. Inhibitory PSPI-21 a PKSI vykazovaly *in vitro* inhibiční účinky na růst mycelia a klíčení konidií houby *Fusarium culmorum* (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; REVINA *et al.* 2008). Dalším proteinem této skupiny je pravděpodobně protein AFP-J o molekulové hmotnosti 13,5 kDa, který vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu, chymotrypsinu a pepsinu. Byla u něj zjištěna silná aktivita vůči kvasinkám *Candida albicans*, *Trichosporon beigelii* a *Saccharomyces cerevisiae*. Antifugální aktivita nebyla u tohoto proteinu zaznamenána (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; PARK *et al.* 2005).

Dalším proteinem patřící do této skupiny je protein potige-G.

- 6) **Ostatní serinové inhibitory proteáz (OSPI; Other Serine Protease Inhibitors):** 21 kDa velké, hodnota isoelektrického bodu 7,5 – 8,8; skupina obsahuje 2 zástupce (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001). Protein je složen ze dvou polypeptidových řetězců (velký řetězec A o velikosti 16,5 kDa a malý řetězec B o velikosti 4,4 kDa) spojených disulfidickou vazbou a obsahuje dvě na sobě nezávislá aktivní místa (VALUEVA *et al.* 1999; VALUEVA, REVINA, MOSOLOV 1999). Byl také zaznamenán vliv inhibice na růst nádorových buněk (KIM *et al.* 2009; HUANG *et al.* 1997; CARMEN *et al.* 1998; KENNEDY 1998).
- 7) **Bramborový karboxypeptidázový inhibitor proteáz (PCI, Potato Carboxypeptidase Inhibitor):** 4,3 kDa velký; 1 zástupce (bílkovina PCI); (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007; POUVREAU *et al.* 2001). Karboxypeptidázový inhibitor obsahuje 39 aminokyselin a 3 disulfidické můstky a je antagonistický

k lidskému epidermálnímu růstovému faktoru (KIM *et al.* 2009, BLANCO-APARICIO *et al.* 1998). Inhibovaným enzymem je karboxypeptidáza A (HANUSOVÁ & ČURN 2006). PCI vykazuje vysokou míru termostability (BÁRTOVÁ *et al.*, 2012; POUVREAU *et al.* 2001).

Nejvíce zastoupenými skupinami inhibitorů jsou PI-2 a PCPI, které představují 22 a 12 % ze všech proteinů v hlíze bramboru (*Solanum tuberosum L.*) (HANUSOVÁ & ČURN 2006; POUVREAU *et al.* 2001). Karboxypeptidázový inhibitor a serinový inhibitor proteáz brambor má inhibiční účinek na růst nádorových buněk (KIM *et al.* 2009; BLANCO-APARICIO *et al.* 1998; KENNEDY 1998; HUANG *et al.* 1997).

1.4.5. Ostatní bílkoviny

Mezi tyto bílkoviny jsou řazeny všechny ostatní bílkoviny nevyhovující předchozím dvěma skupinám. Řadíme sem molekuly s vysokou molekulovou hmotností nad 45kDa. Do této skupiny jsou řazeny například hlízový lektin, fosforyláza (80kDa) nebo syntax škrobu (BÁRTA & BÁRTOVÁ 2007). Lektiny jsou zapojeny do obranného mechanismu rostlin, v kterém navozují shlukování buněk. Některé z lektinů jsou v případě požití toxické i pro savce (HANUSOVÁ & ČURN 2006; CARLINI & GROSSI-DE SÁ 2002). Do této skupiny proteinů řadíme dále polyfenoloxidázy (enzymy podílející se na produkci škrobu) a isoenzymy fosforylázy (HANUSOVÁ & ČURN 2006; POUVREAU *et al.* 2001).

1.4.6. Další skupiny antimikrobiálních proteinů *Solanum tuberosum L.*

1.4.6.1. Defensiny a thioniny

Defensiny jsou skupinou malých 5kDa (HEŘMANOVÁ *et al.* 2006; SELITRENNIKOFF 2001; TERRAS 1994) proteinů bohatých na cystein (KIM *et al.* 2009; GARCIA-OLMEDO *et al.* 1998) a jejich mechanismus účinku není zcela znám (BÁRTOVÁ *et al.* 2012; HEŘMANOVÁ *et al.* 2006). Defensiny izolované z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum L.*) jsou charakterizovány pouze částečně bez přesné znalosti mechanismu jejich působení (BÁRTOVÁ *et al.* 2012).

Tab. 2: Vybrané proteiny *Solanum tuberosum* L.

Upraveno podle BÁRTOVÁ *et al.* (2012), KIM *et al.* (2009) a FENG *et al.* (2003).

	Název proteinu	Základní biochemické vlastnosti proteinu	Antimikrobiální aktivita proteinu
DEFENSINY	Snakin-1 (StSN1)	6,9 kDa velký bazický peptid, jehož struktura obsahuje 63 aminokyselinových zbytků (12 z nich je cysteinových a tvoří 6 sulfidických můstků)	Protein je v rostlině exprimován konstitutivně v různých tkáních v průběhu vývoje rostliny. Protein vykazuje aktivitu vůči <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> nebo <i>Botrytis cinerea</i> při koncentracích nižších než 10 uM. Způsobuje agregaci G ⁺ a G ⁻ bakterií
	Snakin-2 (StSN2)	7 kDa velký bazický peptid, jehož struktura je tvořena signálním proteinem a následnou sekvencí 66 aminokyselinových zbytků	Exprimován v hlízách, stoncích, květech a listech. Vykazuje aktivitu i při velmi nízké koncentraci (1-2 uM) vůči rozsáhlé skupině houbových i bakteriálních patogenů.
	Pseudothionin bramboru (StPth1)	5kDa velký peptid tvořený 47 aminokyselinami, který má schopnost způsobovat agregaci lyosomů, což naznačuje schopnost peptidu interagovat s membránovými strukturami buňky	Vykazuje aktivitu vůči významným bakteriálním a houbovým patogenům brambor, např. <i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> , <i>Pseudomonas syringe</i> pv. <i>syringe</i> , houbovým patogenům <i>Fusarium solani</i> , <i>Coletotrichum coccoides</i> a <i>Botrytis cinerea</i> , atd. Vysoká koncentrace StPth1 byla nalezena v květech, listech a hlízách bramboru (<i>Solanum tuberosum</i> L.)
	DL1	Mohou být fylogeneticky příbuzní s proteiny hadích jedů tzv. hadími desintegranty, se kterými vykazují podobné vlastnosti	Inhibice růstu bakterie <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Schopnost agregace lyosomů zjištěna nebyla

	DL2		<p>Inhibice růstu bakterie <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i></p> <p>Schopnost agregovat lyposomy, což naznačuje schopnost peptidu interagovat s buněčnými membránami inhibovaných bakteriálních buněk</p>
	AP₁ protein	<p>32 kDa velký protein s přítomností 343 aminokyselin obsahující C-terminální doménu, která má schopnost vazby na ATP. Aminokyselinová sekvence N-konce proteinu vykazuje 58 % podobnost s kyselou fosfatázou izolovanou z druhu <i>Mesorhizobium loti</i> a 53 % podobnost s <i>Burkholderia pseudomallei</i>. Předpokládá se, že funkce AP₁ proteinu má souvislost s fosforylací a energetickým metabolismem rostliny</p>	<p>Inhibice vůči pěti patovarům bakteriálního patogena <i>R. solanacearum</i> a houbovým patogenům <i>Alternaria solani</i>, <i>Ralstonia solani</i>.</p>
	Bramborový lektin (STA)	<p>Na chitin se vázající bílkovina složená z lektinové a glykoproteinové domény bohaté na hydroxyprolin</p> <p>Bramborový lektin v nativním stavu má hmotnost 100 kDa, přičemž 50 % (w/w) představuje hmotnost sacharidické složky</p>	<p>schopnost inhibovat růst hyf a klíčení spor hub <i>Trichoderma viride</i> a <i>Botrytis cinerea</i></p>
ASPARTÁTOVÉ PROTEASY	StAP1		<p>Antimikrobiální i proteolytická funkce</p> <p>U <i>Solanum tuberosum</i> byly identifikovány 3 aspartátové proteázy: StAP1 z hlíz brambor, StAP2 a StAP3 z listů brambor</p> <p>Pravděpodobně hrají klíčovou úlohu v obraně vůči <i>P. infestans</i> a konidií <i>F. solani</i>, kde podstatou je pravděpodobně jejich schopnost interakce StAP proteinů s povrchem spor a hyf zmiňovaných patogenů a následným zvýšení permeability buněčných membrán</p>
	StAP2	<p>40 kDa velký monomerní glykoprotein s hodnotou pH kolem 3, který je inhibován pepstatinem</p>	
	StAP3		

	<p>Potide-G</p>	<p>5,6 kDa velký termostabilní protein, který téměř kompletně potlačuje proteolytickou aktivitu trypsinu, chymotrypsinu a papainu.</p> <p>N-terminální sekvence proteinu je identická s bramborovým inhibitorem proteáz Kunitzova typu</p>	<p>Silná inhibice růstu různých bakterií např. <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i> a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganinse</i> a hub <i>Candida albicans</i>, <i>Rhizoctonia solan</i>, atd.</p>
	<p>Potamin-1 (PT-1)</p>	<p>Peptid je složen z polypeptidového řetězce spojeného disulfidovými můstky, které jsou nezbytné pro jeho antimikrobiální aktivitu.</p> <p>Trypsin-chymotrypsin inhibitor proteáz (Obecně trypsin/chymotrypsin inhibitory utvářejí dimer intermolekulární disulfidickou vazbou. Tato disulfidická vazba je klíčovou k udržení protiproteolytické aktivity)</p> <p>N-terminální sekvence peptidu je z 62 % homologní se serinovým inhibitorem proteáz, který patří do Kunitzovy rodiny a peptid inhibující chymotrypsin, trypsin a papain.</p>	<p>Silná inhibice patogenních mikrobiálních kmenů zahrnujících <i>Candida albicans</i>, <i>Rhizoctonia solani</i> nebo <i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganinse</i></p>

1.5. Použité bakteriální kultury

V experimentální části byly použity 3 druhy zemědělsky významných patogenů, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* a *Clavibacter michiganensis*.

1.5.1. *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*)

E. carotovora subsp. *carotovora* má široký hostitelský okruh. Za příznivých podmínek je s to napadnout dužnaté orgány prakticky kteréhokoliv druhu rostlin (KÚDELA *et al.* 2002), kterým rozrušuje pletiva tím, že rozpouští pektinové střední lamely mezi jednotlivými buňkami (ČAČA *et al.* 1981). Bakterie je běžná v mírném i tropickém podnebním pásmu (KÚDELA *et al.* 2002), má tyčinkovitý tvar, je gramnegativní a vyskytuje se v řetězcích (ČAČA *et al.* 1981). Patří k ekonomicky nejzávažnějším fytopatogenům, zejména u transportovaných a skladovaných produktů. V zimě, při teplotách pod 5°C, je koncentrace bakterií nízká (1 buňka/ml). Na jaře a v létě, kdy teplota vody stoupne přes 20°C je koncentrace mnohem vyšší (až 100 buněk/ml) (KÚDELA *et al.* 2002).

Kromě brambor se nejčastěji vyskytuje u skladované řepy, mrkve a celeru, na plodech tykvovitých rostlin a rajčete. *Erwinie* způsobují měkkou hnilobu rostlinných pletiv, avšak může proniknout do cév xylému a vyvolat systémové onemocnění projevující se vadnutím nebo zakrslostí. Běžně se vyskytuje u mnohých plodin jako kontaminant nebo komenzál. Hlavní škodlivost se projevuje ve formě hniloby hlíz během skladování; rozsah celkových ztrát dosahuje 5 % i více (KÚDELA *et al.* 2002).

Způsobuje onemocnění brambor zvané černání stonku (angl. *blackleg*) a měkká hniloba hlíz (angl. *soft rot*) (KÚDELA *et al.* 2002).

1.5.2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomati*

Většina druhů je běžnými obyvateli půdy a vod, některé jsou patogeny pro živočichy (včetně člověka), jiné pro rostliny nebo houby. V rámci druhu *P.syringae* je známo asi 48 různých patovarů. Z nich k nejdůležitějším patří: původci skrvnitosti nadzemních orgánů (pv. *syringae*, pv. *coronafaciens*, pv. *phaseolicola*, pv. *tomato*, pv. *lachrymans* aj.), korkové nekrózy u dřevin (pv. *morsprunorum*, pv. *persicae* aj.). Bakterie *P.syringae* pv. *syringae* jsou běžnou součástí epifytické mikroflóry na širokém okruhu rostlin, jsou to rovné krátké tyčinky, 0,5-1,0 x 1,5-5 um velké, gramnegativní, nesporulující, pohyblivé jedním nebo více polárními bičíky. Jsou aerobní, mají aerobně respirační metabolismus. Kolonie jsou většinou šedobílé, průhledné. Důležitým diferenciačním biochemickým znakem patovarů *P.syringae* je neschopnost tvorby oxidázy. Kmeny pv. *syringae* vykazují ledově krystalizační aktivitu.

Pseudomonas syringae tak plní jako epifyt významnou funkci katalyzátoru tvorby ledu, a podílí se tak na mrazových škodách způsobovaných během vegetace pozdními jarními nebo časnými podzimními mrazy (KŮDELA *et al.* 2002).

Je to příležitostný patogen, způsobující různé typy příznaků. Je pravděpodobné, že uvnitř *P.syringae* jsou kmeny specializované na určité hostitele. V podmínkách příznivých pro patogena mohou být ztráty na výnosech vysoké, zejména u peckovin. Patogen přežívá ve spojení s rostlinnými pletivy (v pupenech dřevin, v semenech). Snadno se šíří větrným deštěm. Do rostliny proniká přes průduchy, nektartody a poranění způsobená řezem, hmyzem, krupobitím apod. V populaci pv. *syringae* jsou také nepatogenní kmeny (KŮDELA *et al.* 2002).

1.5.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* patří do skupiny grampozitivních bakterií. V tomto rodu jsou zastoupeni typičtí okluzogeni specializovaní na kolonizaci cév (trachejí). Vyznačuje se tyčinkovitým až kyjovitým tvarem. Optimální růstová teplota je 20-29°C; maximum 29-35°C. Jednotlivé poddruhy *Clavibacter michiganensis* napadají určitý okruh hostitelských rostlin, např. subsp. *michiganensis* rajče, subsp. *insidiosus* vojtěšku, subsp. *sepedonicus* brambor. Původcem mozaiky listů pšenice je *C. michiganensis* subsp. *tesselarius* (KŮDELA *et al.* 2002).

Způsobuje onemocnění brambor zvané kroužkovitost (angl. *ring rot*), vadnutí a odumírání rostlin bramboru nebo bakteriální vadnutí rajčat.

1.6. Resazurinový test

Resazurin je netoxické, ve vodě rozpustné barvivo, které je redukováno reakcí založenou na přenosu elektronů spojenou s dýcháním a produkcí resorufinu. Resorufin je ve vodě rozpustný produkt, který je snadno měřitelný fluorescenčním nebo viditelným světlem spektrometru (MARISCAL *et al.* 2009; O'BRIEN *et al.* 2000). Po redukcí změni resazurin barvu z modré na růžovou a poté až na bezbarvou v souvislosti s kyslíkem jako limitujícím faktorem uvnitř média (MARISCAL *et al.* 2009; TWIGG 1945).

První stupeň redukce nastává kvůli ztrátě volně vázaných atomů kyslíku na dusík fenoxazinového skeletu. Tato změna na růžový resorufin je nevratná atmosférickým kyslíkem a je do značné míry nezávislá na obou redukčních potenciálech a obsahu kyslíku. Druhý stupeň redukce na bezbarvý stupeň je atmosférickým kyslíkem vratný (MARISCAL *et al.* 2009; GUERIN *et al.* 2001). Resazurin je velmi stabilní v kultivačním médiu bez buněk, ale v přítomnosti žijících buněk je velmi rychle redukován (MARISCAL *et al.* 2009). Resazurin je proto používán k posouzení životnosti a bakteriální kontaminace a je vhodný k testování antimikrobiální aktivity jako indikátoru počtu bakteriálních buněk (MARISCAL *et al.* 2009; SHILOH *et al.* 1997; SARKER *et al.* 2007).

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Bakteriální kultury

V rámci řešení bakalářské práce byly použity následující bakteriální druhy, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Česká sbírka mikroorganismů, Brno), *Pseudomonas syringae* (Ing. Pavel Beran, AV ČR), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Česká sbírka mikroorganismů, Brno). Uvedené kultury byly kultivovány na živném agaru typu Nutrient agar (NA), jehož příprava byla provedena dle postupů výrobce a (Oxoid, Canada). Bakteriální kultury byly kultivovány ve tmě při 25°C po dobu 72 hodin a následně použity pro řešení níže uvedených postupů optimalizace laboratorních technik.

2.2. Příprava modifikovaného proteinu hlíz bramboru

Hlízy odrůd Bella a Westamyl byly umyty, osušeny a nakrájeny na menší kousky. Šťáva z brambor byla získána na domácím odšťavovací (AEG). K získané šťávě byl přidán antioxidant, 2% (w/v) roztok NaHSO₃. Bramborová šťáva byla centrifugována (15 min; 3600 g; 4°C) a tekutý podíl byl přefiltrován papírovým filtrem KA 1 (rychlá filtrace), Fischer. Před vlastní izolací celkového proteinu bylo pH bramborové šťávy upraveno pomocí 0,5 M H₂SO₄ na hodnotu pH 5,0. K 30 ml takto upravené šťávy bylo přidáno 10,5 ml podchlazeného etanolu. Precipitace hlízového proteinu probíhala po dobu 1 hodiny při teplotě 0-4°C („na ledu“). Vzorky byly poté centrifugovány (10 min; 4°C; 3600g) a dvakrát promyty přidáním 20 ml 0,1M Na-acetátového pufru pH 5,0 s ekvivalentním množstvím etanolu pro udržení precipitovaného stavu. Poté byly vzorky vysušeny lyofilizací. Tento proteinový izolát byl použit pro následné modifikace esterifikací. Methylace získaných proteinových izolátů byla provedena dle metodik pracoviště.

2.3. SDS-PAGE analýza modifikovaného proteinu hlíz bramboru

Vzorky modifikovaných proteinů odrůd Bella a Westamyl a původních proteinů těchto odrůd před metylací byly extrahovány s využitím extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% 2-merkptoethanol, 2% SDS). Extrakce probíhala po dobu 4 hodin při teplotě 4°C. Po centrifugaci (10 min, 9000g, 4°C), byl čistý supernatan přenesen do nové mikrocentrifugační zkumavky s příslušným množstvím (4:1) nanášecího pufru (5 x NP: 5 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,3 g SDS, 10 ml glycerol, 5 mg Bromphenol Blue; k 1 ml se těsně před použitím přidá 340 µl 2-merkptoethanolu). Před nanesením na gel v množství 10 µl byl vzorek vařen ve vodní lázni.

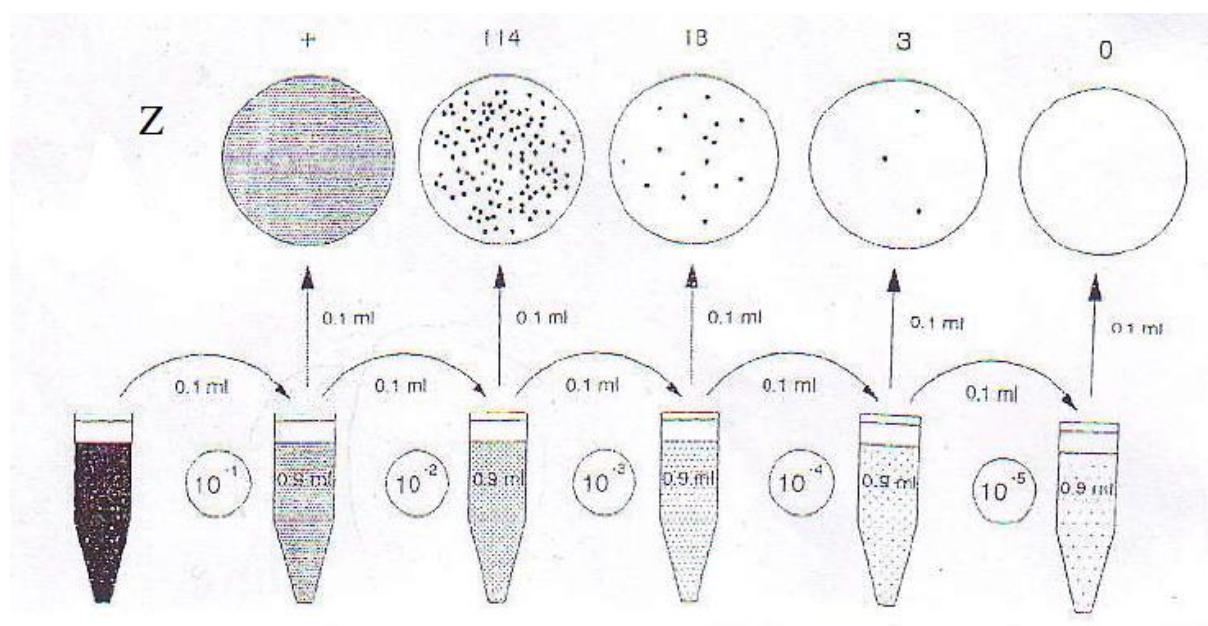
Pro vlastní SDS-PAGE analýzu byla použita diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrilamydovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) – 4% zaostřovací gel (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 + SDS) a 10% separační gel (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 + SDS) – v prostředí systému 0,025 M Tris + 0,192 M glycine (pH 8,3) + SDS. Separace probíhala při proudu 40 mA na gel, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4 hod.

Detekce bílkovinných pruhů byla provedena barvením gelů v roztoku Coomasie Brilliant Blue přes noc (barvicí směs – methanol, ledová kys. Octová, voda v poměru 5:1:4 + 0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Po detekci bylo odbarveno nespecifické pozadí (použitá směs etanol: kyselina octová: voda v poměru 2,5:1:6,5 s výměnou během odbarvení 2 – 3x) a provedena fixace a dehydratace ve směsi 45% etanolu + 3% glycerolu. Následně byly gely sušeny v celofánu na skle při laboratorní teplotě na vzduchu po 2-3 dny. Gely byly digitalizovány prostřednictvím scanneru do podoby TIFF formátu a vizuálně vyhodnoceny.

2.4. Stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody

K bakteriální kultuře staré 72 hod se přidá 1 ml sterilní dH₂O a 0,5 ml sterilního smáčedla. Kulturu opatrně setřeme kultivační kličkou a přepipetujeme do sterilní 2,0 ml mikrozkušavky. Tato mikrozkušavka je výchozí originální bakteriální suspenze o neznámé koncentraci; obsah zkumavky se pečlivě zhomogenizuje. Pro vytvoření koncentrační řady si připravíme sterilní mikrozkušavky označené (10^{-1} až 10^{-5}). Do každé tuby se napipetuje 0,9 ml sterilní dH₂O a postupná koncentrační řada se vytvoří tím, že do mikrozkušavky s označením 10^{-1} s 0,9 ml dH₂O se napipetuje 0,1 ml základního roztoku. Tato směs se důkladně promíchá a odebere se 0,1 ml, které přidáme do mikrozkušavky s označením 10^{-2} . Na tomto principu se vytvoří koncentrační řada až do 10^{-5} . Vytvořené roztoky se pečlivě promíchají a následně z každého odebere 0,1 ml suspenze a přenese na Petriho misku obsahující Nutrient agar a sterilně skleněnou „hokejkou“ rozetře po povrchu agaru. Po uplynutí 24 hod. se počet vytvořených bakteriální kolonií zhodnotí. Hodnotí se počet počítatelných kolonií (tzn. počet kolonií mezi 10 až 100). Titr bakteriální suspenze je stanoven ve dvou opakováních. Stanovení koncentrace propagulí v 1 ml původní bakteriální suspenze (Z) se vypočítá podle vzorce: počet bakterií/ml = počet detekovatelných kolonií x ředící faktor tuby x ředící faktor výsevu.

Obr. 1: Metoda MPN při stanovení koncentrace bakteriální suspenze



2.5. Stanovení titru bakterií pomocí McFarlandových standardů (*McFarland Turbidity Standards*)

Metoda stanovení titru je založena na vizuelním porovnání zakalení bakteriální suspenze a tzv. McFarlandových roztoků. McFarlandovy standardy byly připraveny smícháním 1% (v/v) H_2SO_4 a 1% (w/v) BaCl_2 dle schématu uvedeného v tabulce č. 3.

Tab. 3: Schéma přípravy McFarlandových roztoků

Stupnice McFarland	1% (w/v) BaCl_2 (ml)	1% (v/v) H_2SO_4 (ml)
0,5	0,05	9,95
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6
5	0,5	9,5
6	0,6	9,4
7	0,7	9,3
8	0,8	9,2
9	0,9	9,1
10	1,0	9,0

Absorbance roztoků byla měřena spektrometrem CHROM Biomate 5 (Thermo Electron corporation, ČR) při vlnové délce 625 nm ve 3 opakování.

2.6. Hodnocení antibakteriální aktivity vybraných látek pomocí resazurinového testu

Principem metody je změna zbarvení resazurinového barviva z modré na růžovou v reakci na redukci tohoto barviva v přítomnosti žijících buněk. V rámci tohoto testu byla hodnocena antibakteriální aktivita hlízového proteinu brambor izolovaného z odrůd Westamyl a Bella. Modifikovaný protein obou odrůd byl použit ve dvou koncentracích, a to 1 a 10 mg/ml. Jako pozitivní kontrola bylo zvoleno širokospektrální antibiotikum Tetracyklin v postupně klesajících koncentracích 1 až 0,001 mg/ml. Antibakteriální aktivita zmíněných látek byla testována na bakteriálních druzích *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. V testech byla použita bakteriální suspenze druhů *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* a *P. syringae* pv. *tomati* o koncentraci 1×10^4 CFU.ml⁻¹ a v koncentraci $3,5 \times 10^3$ u druhu *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Vlastní analýza antibakteriální aktivity testovaných látek proběhla na destičce, kdy každá z testovaných variant měla dvě opakování. Varianty testu byly následující:

- 1) **Kontrola:** 50μl ISB (Iso Sensi Broth médium); 10 μl resazurin (1% v/v), 10 μl bakteriální suspenze o přesné koncentraci
- 2) **Test antibakteriální aktivity modifikovaného hlízového proteinu:** 50μl ISB (Iso Sensi Broth médium); 10μl resazurin (1% v/v), 10μl bakteriální suspenze o přesné koncentraci; 50μl modifikovaný hlízový protein odrůd Bella a Westamyl ve dvou koncentracích, a to 1 a 10 mg.ml⁻¹.
- 3) **Test antibakteriální aktivity širospektrálního antibiotika (pozitivní kontrola):** 50μl ISB (Iso Sensi Broth médium); 10μl resazurin (1% v/v), 10μl bakteriální suspenze o přesné koncentraci; 50μl antibiotika v koncentracích 1 až 0,001 mg.ml⁻¹.

Destička s připravenými variantami testu byla kultivována při 25°C a změny zbarvení resazurinového barviva byly průběžně sledovány a fotograficky zaznamenávány. Po uplynutí 48 hodin testu byla sledovaných variant testu vyhodnocena optická densita při 620 nm (spektrofotometr CHROM Biomate 5).

2.7. Statistické vyhodnocení získaných dat

Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí statistického programu StatSoft 6.0.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Optimalizace postupů stanovení přesné koncentrace suspenze zvolených bakteriálních druhů

V tabulce č. 4 jsou uvedeny koncentrace stanovené u vybraných bakteriálních druhů pomocí kvantifikační metody označované jako MPN (*most-probable number method*). Z uvedených výsledků vyplývají výrazné rozdíly (statisticky průkazné při $P < 0,05$) mezi studovanými druhy. Vzhledem k tomu, že příprava analyzované bakteriální suspenze byla u všech třech druhů prováděna stejným způsobem, mohou tyto výsledky naznačovat rozdílnou dynamiku růstu populací testovaných druhů. Variační koeficient metody MPN se v rámci souboru testovaných bakteriálních druhů pohyboval v rozpětí od 6,3 do 12,3%. Chyba uvedené metody je tedy výrazně vyšší než metody využívající McFarlandovy roztoky (variační koeficient od 0,3 do 1,2% (viz. tabulka 5).

Tab. 4: Stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody (*most-probable number method*)

Bakteriální druh	Koncentrace bakteriální suspenze (CFU/1ml)		Hodnota směrodatné odchylky	Variační koeficient (%)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	25 1750	b*	503322,3	6,3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomati</i>	$2,5 * 10^5$	a	31069,8	12,3
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	$3,5 * 10^3$	c	230,9	6,6

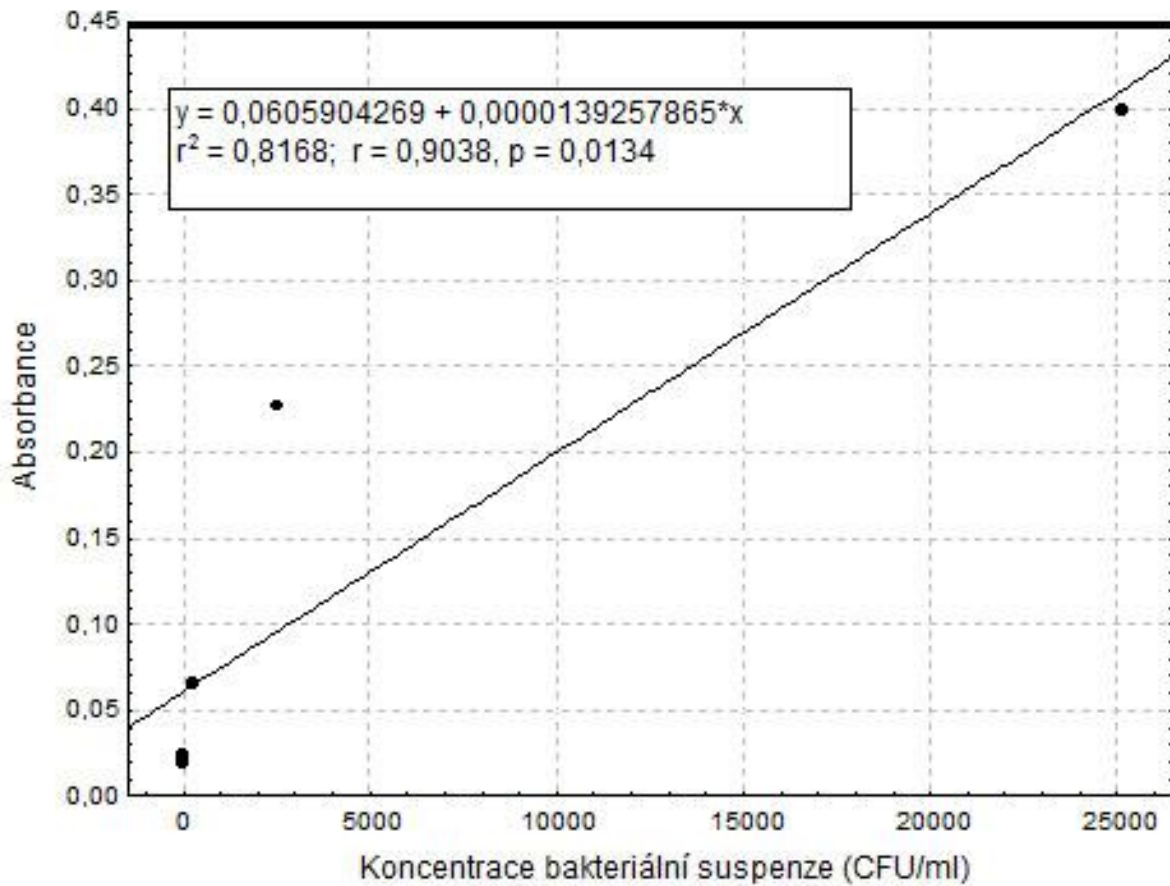
* neshodná písmena označují statisticky průkazný rozdíl mezi sledovanými hodnotami při $\alpha = 0,05$.

Tab. 5: Stanovení density McFarlandových roztoků

Stupnice McFarlandových roztoků	Turbidita roztoku při 620 nm	Hodnota směrodatné odchyly	Variační koeficient (%)
0,5	0,126	0,0038	3,0
1	0,221	0,0072	3,3
2	0,460	0,0025	0,5
3	0,635	0,0076	1,2
4	0,894	0,0049	0,6
5	1,058	0,0070	0,7
6	1,288	0,0064	0,5
7	1,447	0,0151	1,0
8	1,540	0,0175	1,1
9	1,717	0,0057	0,3
10	1,828	0,0081	0,4

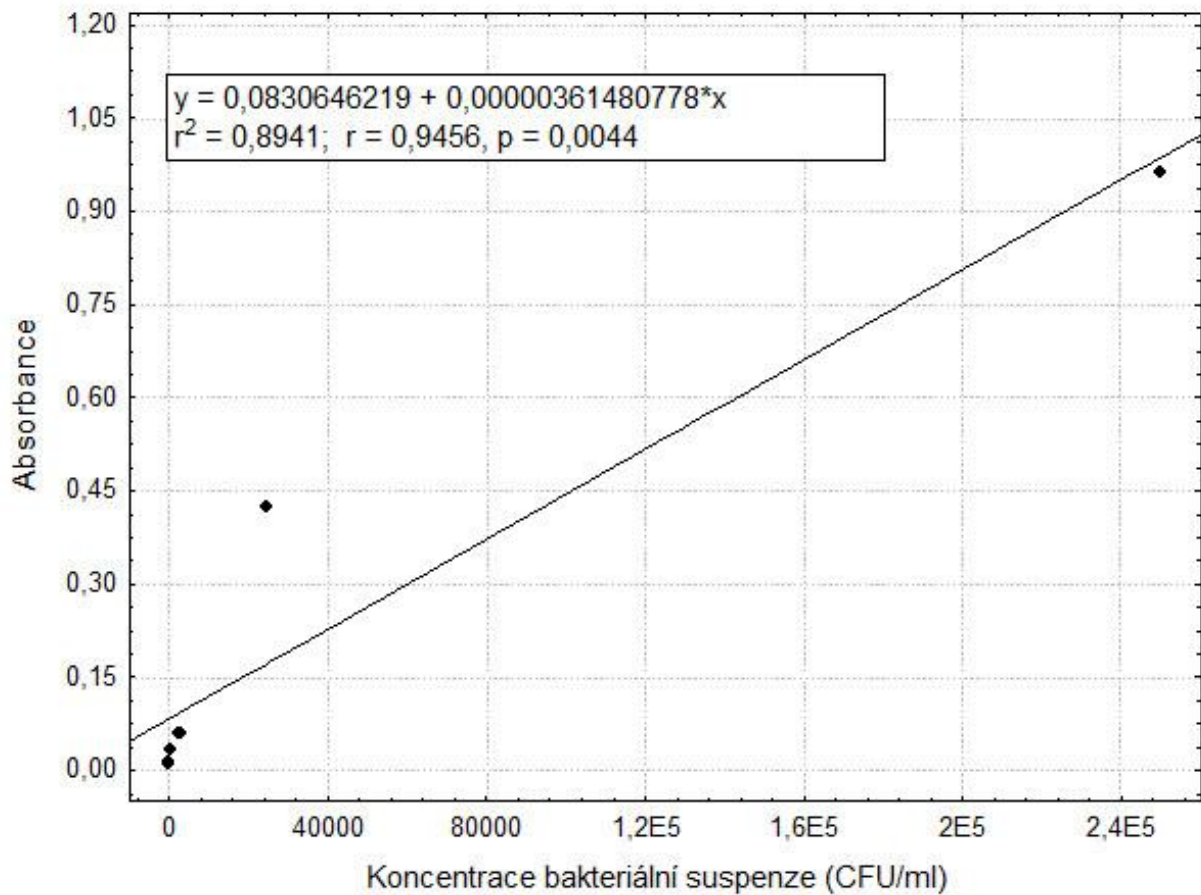
Tabulka č. 5 znázorňuje stanovení density McFarlandových roztoků při 620 nm. Absorbance jednotlivých McFarlandových roztoků pracuje s variačním koeficientem od 0,3 do 3,3 %. Tento rozsah je způsoben rychlou usazovací tendencí McFarlandových roztoků a tím možnou chybou měření turbidity roztoku.

Obr. 2: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm



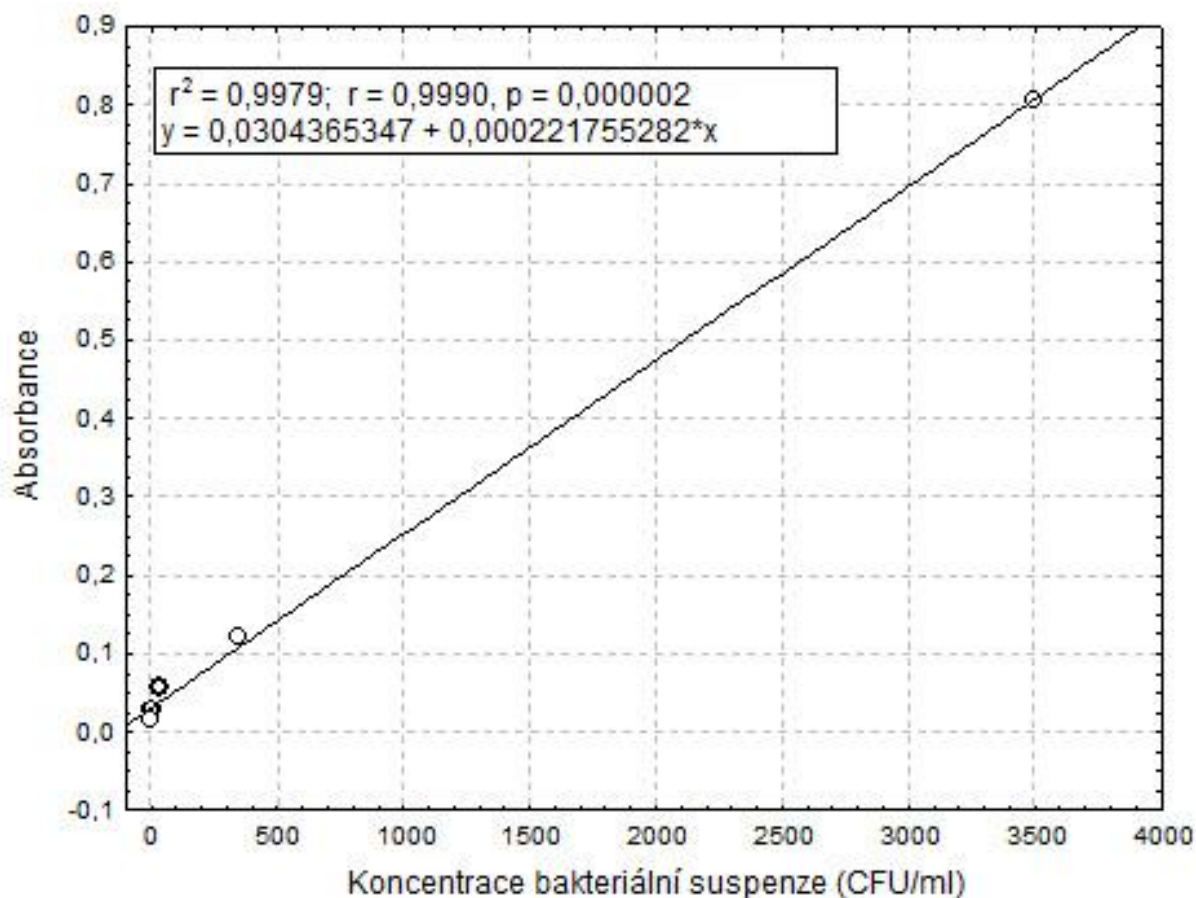
Na obrázku č. 2 je znázorněna křivka představující závislost koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) na detekované turbiditě suspenze při 620 nm. Regresní rovnice křivky vyjadřuje závislost změny naměření density roztoku bakteriální suspenze detekované hodnoty CFU. Tato regresní rovnice umožňuje pro druh *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* vytvořit optimalizovaný odečet neznámé koncentrace bakteriální suspenze na základě stanovení density roztoku či porovnáním s McFarlandovými roztoky.

Obr. 3: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm



Na obrázku č. 3 je znázorněna křivka představující závislost koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) na detekované turbiditě suspenze při 620 nm. Regresní rovnice křivky vyjadřuje závislost změny naměřené density roztoku bakteriální suspenze a detekované hodnoty CFU. Tato regresní rovnice umožňuje pro druh *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* vytvořit optimalizovaný odečet neznámé koncentrace bakteriální suspenze na základě stanovení density roztoku či porovnáním s McFarlandovými roztoky.

Obr. 4: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm



Na obrázku č. 4 je znázorněna křivka představující závislost koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) na detekované turbiditě suspenze při 620 nm. Regresní rovnice křivky vyjadřuje závislost změny naměřené density roztoku bakteriální suspenze a detekované hodnoty CFU. Tato regresní rovnice umožňuje pro druh *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* vytvořit optimalizovaný odečet neznámé koncentrace bakteriální suspenze na základě stanovení density roztoku či porovnáním s McFarlandovými roztoky.

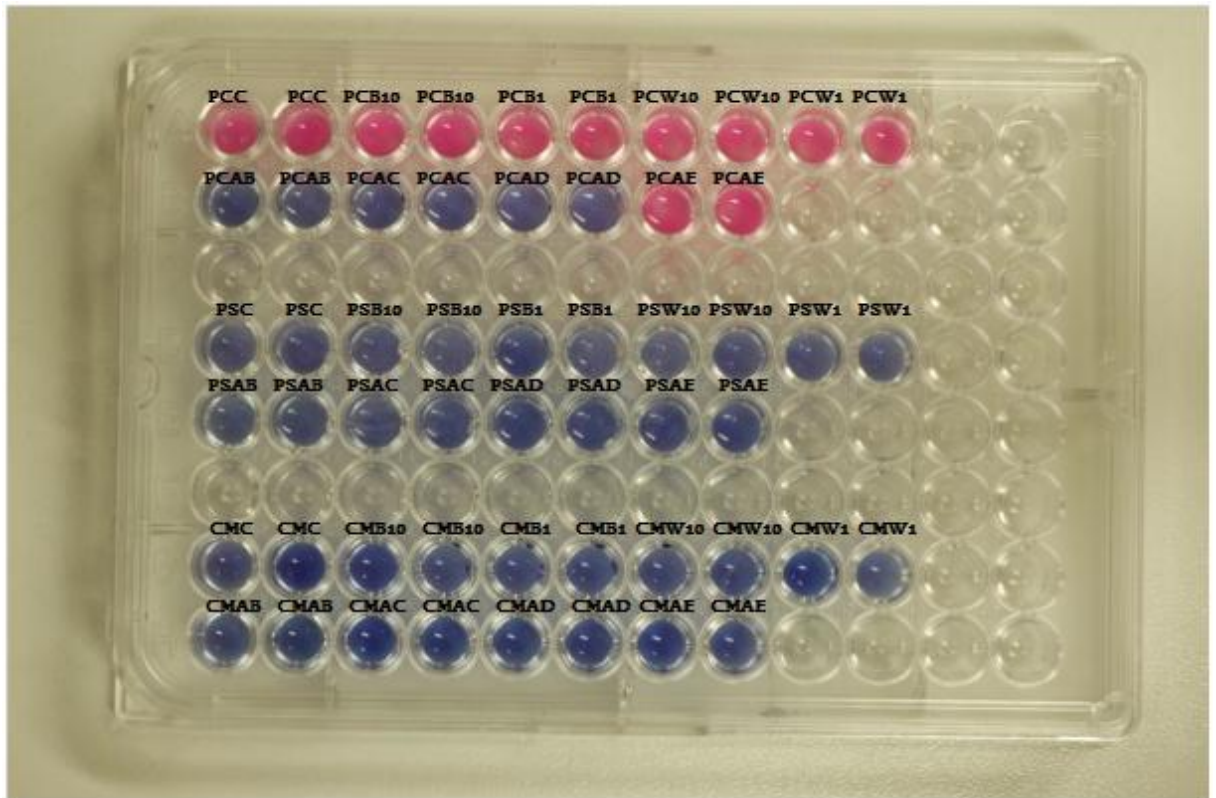
Tab. 6: Vztah koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) hodnocených druhů vůči McFarlandovým roztokům dle zjištěného korelačního vztahu

Stupnice McFarlandových roztoků	Turbidita roztoku při 620 nm	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (CFU/ml)	<i>P. syringe</i> pv. <i>tomati</i> (CFU/ml)	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (CFU/ml)
		$y = 0,06059 + 0,0000139*x$	$y = 0,08306 + 0,00000361*x$	$y = 0,03044 + 0,0002217*x$
0,5	0,126	4706	11895	431
1	0,221	11540	38211	859
2	0,460	28735	104416	1938
3	0,635	41324	152892	2727
4	0,894	59958	224637	3895
5	1,058	71756	270066	4635
6	1,288	88303	333778	5672
7	1,447	99742	377823	6389
8	1,540	106432	403584	6809
9	1,717	119166	452615	7607
10	1,828	127152	483363	8108

Tabulka č. 6. znázorňuje vztah koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) hodnocených druhů vůči McFarlandovým roztokům dle zjištěného korelačního vztahu a na základě zjištěných hodnot density u jednotlivých koncentrací McFarlandových roztoků.

3.2. Hodnocení resazurinového testu

Obr. 5: Destička s resazurinovým testem po 12 hodinách inkubace při 25°C



PC *Pectobacterium carotovorum*

PS *Pseudomonas syringae*

CM *Clavibacter michiganensis*

C kontrola

B1 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 1 mg/ml

B10 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 10 mg/ml

W1 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 1 mg/ml

W2 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 10 mg/ml

A (B-E) antibiotikum o různé koncentraci (**B** = 1mg/ml, **C** = 0,1mg/ml; **D** = 0,01 mg/ml; **E** = 0,001mg/ml)

Po 12 hodinách inkubace resazurinového testu při 25°C byla vizuálně hodnocena změna zbarvení indikující růst u bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* v přítomnosti modifikovaných proteinů. Kromě kontroly, kde se změna z důvodu absence inhibiční látky předpokládá, byl dále pozorován růst bakterie v přítomnosti modifikovaného hlízového proteinu obou odrůd bez ohledu na použitou koncentraci proteinu. Inhibice byla zaznamenána v této fázi testu pouze při použití antibiotika s výjimkou nejnižší koncentrace.

Obr. 6: Destička s resazurinovým testem po 24 hodinách inkubace při 25°C



PC *Pectobacterium carotovorum*

PS *Pseudomonas syringae*

CM *Clavibacter michiganensis*

C kontrola

B1 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 1 mg/ml

B10 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 10 mg/ml

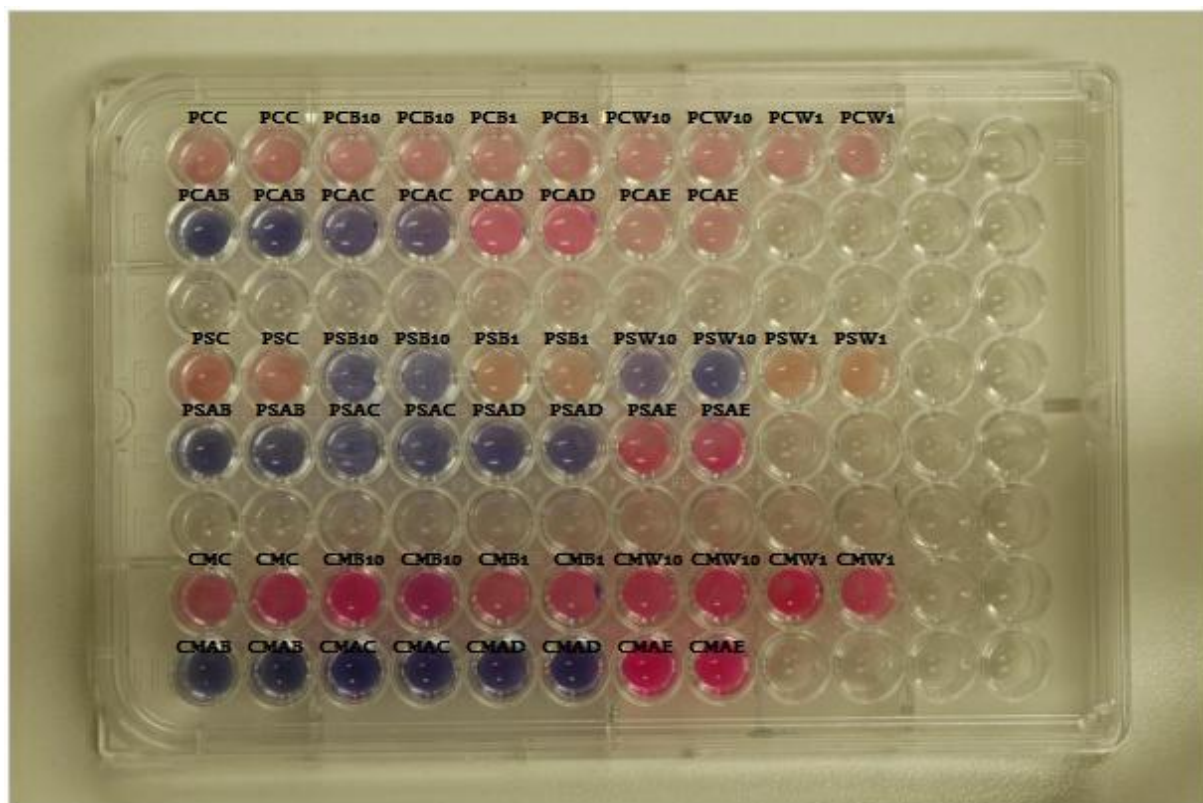
W1 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 1 mg/ml

W2 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 10 mg/ml

A (B-E) antibiotikum o různé koncentraci (**B** = 1mg/ml, **C**= 0,1mg/ml; **D**= 0,01 mg/ml; **E**= 0,001mg/ml)

Po 24 hodinách inkubace resazurinového testu při 25°C byla vizuálním hodnocení detekována změna zbarvení indikující růst u bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* v přítomnosti proteinů obou odrůd a koncentrací, což poukazuje na žádný inhbiční efekt modifikovaných proteinů na růst bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. U bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* je viditelná inhbiční aktivita modifikovaných hlízových proteinů obou odrůd při jejich použití ve vyšších koncentracích, konkrétně koncentraci nad 10 mg/ml.

Obr. 7: Destička s resazurinovým testem 36 hodin po inkubaci při 25°C



PC *Pectobacterium carotovorum*

PS *Pseudomonas syringae*

CM *Clavibacter michiganensis*

C kontrola

B1 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 1 mg/ml

B10 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 10 mg/ml

W1 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 1 mg/ml

W2 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 10 mg/ml

A (B-E) antibiotikum o různé koncentraci (**B** = 1mg/ml, **C**= 0,1mg/ml; **D**= 0,01 mg/ml; **E**= 0,001mg/ml)

Po 36 hodinách inkubace resazurinového testu při 25°C byla zaznamenána trvalá inhibiční aktivita modifikovaných hlízových proteinů obou odrůd o koncentraci 10 mg/ml u bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomati*.

Obr. 8: Destička s resazurinovým testem po 48 hodinách inkubace při 25°C



PC *Pectobacterium carotovorum*

PS *Pseudomonas syringae*

CM *Clavibacter michiganensis*

C kontrola

B1 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 1 mg/ml

B10 modifikovaný protein odrůdy Bella o koncentraci 10 mg/ml

W1 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 1 mg/ml

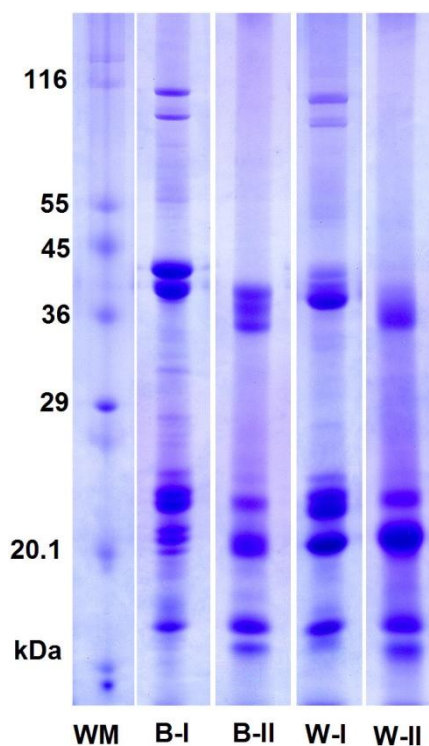
W2 modifikovaný protein odrůdy Westamyl o koncentraci 10 mg/ml

A (B-E) antibiotikum o různé koncentraci (**B** = 1mg/ml, **C** = 0,1mg/ml; **D** = 0,01 mg/ml; **E** = 0,001mg/ml)

Po 48 hodinách inkubace resazurinového testu při 25°C byla zaznamenána vizuální změna zbarvení indikující růst u bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* v přítomnosti modifikovaných proteinů obou odrůd bez ohledu na koncentraci modifikovaného proteinu. U bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomati* byla zaznamenána trvalá inhibiční aktivita modifikovaného proteinu obou odrůd o koncentraci proteinu 10 mg/ml. A u bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nebyla inhibiční aktivita

modifikovaných hlízových proteinů odrůd Bella a Westamyl o koncentraci 1 mg/ml a 10 mg/ml zaznamenána žádná.

Obr. 9: SDS-PAGE spektra hlízových proteinů odrůd Bella a Westamyl před modifikací a po modifikaci



WM hmotnostní marker

B-I SDS-PAGE spektrum hlízových proteinů odrůdy Bella před modifikací

B-II SDS-PAGE spektrum hlízových proteinů odrůdy Bella po modifikaci

W-I SDS-PAGE spektrum hlízových proteinů odrůdy Westamyl před modifikací

W-II SDS-PAGE spektrum hlízových proteinů odrůdy Westamyl po modifikaci

Na obrázku č. 9 jsou na základě SDS-PAGE analýzy hlízových proteinů odrůd Bella a Westamyl zaznamnány významné změny molekulové hmotnosti stěžejních proteinů mezi variantami před modifikací a po modifikaci. V oblasti patatinových proteinů (39-43 kDa) došlo u obou odrůd následkem modifikace k výraznému poklesu molekulové hmotnosti.

4. DISKUZE

Stanovení titru bakterií pomocí McFarlandových standardů je založeno na vizuálním porovnání turbidity McFarlandových roztoků a bakteriální suspenze o neznámé koncentraci za předpokladu, že je systém optimalizován znalostí koncentrace bakterií vztahující se k určité hodnotě turbidity roztoku. Aby mohl být stanoven bakteriální titr, bylo nezbytné nejdříve změřit hodnoty turbidity McFarlandových roztoků při 620 nm, a následně si vytvořit kalibrační křivku, se kterou by bylo možné porovnávat hodnoty turbidity bakteriálních suspenzí. Měření turbidity McFarlandových roztoků bylo komplikováno neustálým usazováním McFarlandových roztoků. Z tohoto důvodu se následně pracovalo s větším objemem a ve třech opakování, aby se minimalizovala chyba vzniklá měřením rychle se usazujících roztoků. Při měření turbidity bakteriálních suspenzí nastal obdobný problém. Docházelo k poměrně rychlému usazování bakteriální suspenze, a proto bylo měření prováděno vždy v několika opakování, z něhož byl vytvořen průměr, se kterým bylo možné dále pracovat. Měření turbidity bakteriální suspenze bylo dále komplikováno obarvením bakteriální směsí kultivačním médiem. Suspenze tedy měla slámovou barvu, což zajisté ovlivnilo hodnoty turbidity.

Další metodou použitou pro hodnocení koncentrace bakteriálního titru byla tzv. MPN metoda. MPN metoda se doporučuje v případě zakaleného vzorku (AMBROŽOVÁ 2004). AMBROŽOVÁ (2004) dále uvádí, že metoda MPN je velice pracná a namísto ní se provádějí metody, které jsou jednodušší a rychlejší. Výsledky této metody mohou být ovlivněny kvalitou naočkování půd. Aby bylo možné stanovit koncentraci bakteriálního titru s co nejmenší chybou, uvádí AMBROŽOVÁ (2004), že je nutné pro každý stupeň ředění zvolit minimálně 3 zkumavky, ideálně však 5 v jedné sérii.

Pro hodnocení inhibiční aktivity modifikovaných proteinů hlíz brambor byl použit tzv. resazurinový test. Jedná se o jednoduchou rychlou metodu, která pracuje efektivně i při malých objemech. Konvenční metodou resazurinového testu je tzv. disková difuzní metoda, která však může být časově náročná a vyžaduje větší množství testovaného materiálu (SARKER *et al.* 2007). V průběhu inkubace destičky s resazurinovým testem byly zaznamenány stejné vizuální změny barev jaké uvádí SARKER *et al.* (2007), tedy od modrého zbarvení resazurinu přes růžové zbarvení resorufinu až následně na bezbarvý hydroresorufin. Tyto barevné změny reagují na změnu oxidačně-redukčního potenciálu způsobenou buněčným růstem.

K hodnocení antimikrobiální aktivity proteinů hlíz brambor byly použity proteiny hlíz bramboru odrůd Bella a Westamyl, které byly podrobeny elektroforetické metodě SDS-PAGE, která podle BÁRTA *et al.* (2010) představuje jednu ze základních metod analýzy proteinů. Na základě analýzy SDS-PAGE je patrné, že v průběhu modifikace proteinů metylací došlo k viditelnému snížení molekulové hmotnosti modifikovaných proteinů, a to zejména u proteinů patatinové oblasti (viz. obrázek č.9). Na obrázku č. 9 si dále můžeme povšimnout přítomnosti bílkovin patatinového komplexu, jejichž molekulová hmotnost podle BÁRTA *et al.* (2010) kolísá v rozsahu od 40 do 43 kDa a je ovlivněna stupněm glykosylace. Dalšími zastoupenými proteiny jsou bílkoviny skupiny inhibitorů proteáz, jejichž molekulová hmotnost je podle BÁRTA & BÁRTOVÁ (2007); CLEVELAND *et al.* (1987); BRZIN *et al.* (1988); SUH *et al.* (1990) a POUVREAU (2004) uváděna v rozmezí od 4,3 kDa do 28 kDa. Modifikace proteinů B-II a W-II byla provedena metylací a nápadné je snížení jejich molekulové hmotnosti oproti stejnému proteinu, který modifikaci podroben nebyl.

5. ZÁVĚR

- Při měření koncentrace bakteriální suspenze jednotlivými metodami byly rozdíly v získaných koncentracích způsobené komplikacemi s měřením turbidity pomocí spektrometru
- Při hodnocení antimikrobiální aktivity pomocí tzv. resazurinového testu bylo zjištěno, že po 48 hodinách byla schopnost inhibice zaznamenána u modifikovaných proteinů obou testovaných odrůd při použití vyšší koncentrace proteinu tzn. 10 mg/ml. u bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

6. SEZNAM PŘÍLOH

Seznam tabulek

Tab. 1: Vybrané antimikrobiální proteiny a jejich zastoupení u živočichů.....	19
Tab. 2: Vybrané proteiny <i>Solanum tuberosum</i> L.	31
Tab. 3: Schéma přípravy McFarlandových roztoků.....	39
Tab. 4: Stanovení koncentrace bakteriální suspenze pomocí MPN metody (<i>most-probable number method</i>).....	41
Tab. 5: Stanovení density McFarlandových roztoků	42
Tab. 6: Vztah koncentrace bakteriální suspenze (CFU/ml) hodnocených druhů vůči McFarlandovým roztokům dle zjištěného korelačního vztahu	46

Seznam obrázků

Obr. 1: Metoda MPN při stanovení koncentrace bakteriální suspenze	39
Obr. 2: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm	43
Obr. 3: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomati</i> (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm	44
Obr. 4: Vztah mezi koncentrací bakteriální suspenze <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (CFU/ml) a detekovanou turbiditou suspenze při 620 nm	45
Obr. 5: Destička s resazurinovým testem po 12 hodinách inkubace při 25°C	47
Obr. 6: Destička s resazurinovým testem po 24 hodinách inkubace při 25°C	48
Obr. 7: Destička s resazurinovým testem 36 hodin po inkubaci při 25°C	49
Obr. 8: Destička s resazurinovým testem po 48 hodinách inkubace při 25°C	50
Obr. 9: SDS-PAGE spektra hlízových proteinů odrůd Bella a Westamyl před modifikací a po modifikaci.....	51

7. SEZNAM ZKRATEK

STA – (*Solanum tuberosum agglutinin*) – bramborový lektin

MPN metoda – (angl. *most-probable number method*) – metoda využívaná ke stanovení koncentrace bakteriální suspenze

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Ambrožová, J. (2004):** Mikrobiologie v technologii vod. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 244 s. ISBN 80-708-0534-X.
2. **Andrews D.L., Beames B., Summers M.D., Park W.D. (1988):** Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem. J.* 252: 199-206.
3. **Bansal, S. (2005):** Molecular cloning studies on patatin gene promoters from potato cultivars. (Diplomová práce) Patiala : Deemed University. 38s.
4. **Bárta, J., Bártová, V. (2007):** Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.): vědecká monografie. 1. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 116 s., ISBN 978-80-7394-036-2.
5. **Bárta, J., Bártová, V., Čurn, V. (2010):** Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy Expresion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chemické listy* 104: 33-40.
6. **Bárta, J., Čurn, V. (2004):** Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické listy* 98: 373-378.
7. **Bártová, V., Bárta, J., Kamenová, A., Staňková, A., Čurn, V. (2012):** Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů brambor (*Solanum tuberosum* L.). *Chemické listy*. In press.
8. **Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J. Souček, A., Vávra, J. (1996):** Lékařská mikrobiologie. 1. Jihlava: Marvil. 558 s.
9. **Bechinger, B., Lohner, K. (2006):** Detergent-like actions of linear amphipathic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1529-1539.
10. **Blanco-Aparicio, C., Molina, M. A., Fernández-Salas, E., Frazier, M. L., Mas, J. M., Querol, E., Avilés, F. X., de Llorens, R. (1998):** Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibitors tumor cell growth. *J. Biol. Chem.* 273: 12370-12377.
11. **Blondelle, S. E., Lohner, K. (2000):** Combinatorial libraries: a tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lytic specificities for structure-activity relationship studies. *Biopolymers* 55: 74-87.
12. **Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., Osborn, R. W. (1997):** Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297–323.

13. **Brzin, J., Popovic, T., Drobnic-Kosorok, M., Kotnik, M., Turk, V. (1988):** Inhibitors of proteinases from potato. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369: 233-238.
14. **Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L. (2004):** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 169-184.
15. **Carlini, C. R., Grossi-de Sá, M. F. (2002) :** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.
16. **Carmen, B.-A., Miguel, A. M., Ester, F.-S., Marsha, L.F., Jos, M. M., Enrique, Q., Francesc, A. A, Rafael, L. (1998):** Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth. *J. Biol. Chem.* 273: 12370-12377.
17. **Cleveland, T. E., Thornburg, R.W., Ryan, C.A. (1987):** Molecular characterisation of a wound inducible inhibitor I gene from potato and the processing of its mRNA and protein. *Plant Molecular Biology* 8: 199-207.
18. **Čača, Z., Kollár, V., Novák, J. B., Zvára, J. (1981):** Zemědělská fytopatologie. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 334.s.
19. **Dennis, S., Galliard, T. (1974):** Wax ester formation catalyzed by isoenzymes of lipolytic acyl hydrolase. *Phytochemistry* 13: 2469-2473.
20. **Doležilková, I., Macková, M., Macek, T. (2011):** Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chemické listy* 105: 346-355.
21. **Epand, R. M., Vogel, H. J. (1999):** Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.
22. **Feng, J., Yuan, F., Gao, Yin, G., Liang, Ch., Xu, J., Zhang, Ch., He, L. (2003):** A novel antimicrobial protein isolated from potato (*Solanum tuberosum*) shares homology with an acid phosphatase. *Biochem. J.* 376: 481-487.
23. **Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H., Hancock, R. E. W. (1999):** Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1542-1548.
24. **Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J., Hancock, R. E. W. (2000):** *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2086-2092.
25. **Galliard, T. (1971):** The enzymatic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. *Biochem. J.* 121: 379-390.
26. **Glazebrook, J. (1999):** Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 280-286.

27. **Guerin, T. F., Mondido, M., McClenn, B., Peasley, B. (2001):** Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading microorganisms. *Lett Appl Microbiol* 32: 340-345.
28. **Guevara, M. G., Oliva, C. R., Machinandiarena, M. & Daleo, G. R. (1999):** Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiol Plant* 106: 164-169.
29. **Guevara, M. G., Daleo, G. R. & Oliva, C. R. (2001):** Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiol. Plant.* 112: 321-326.
30. **Hancock, R. E. W., Chapple, D. S. (1999):** Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317.
31. **Hancock, R. E. W., Scott, M. G. (2000):** The role of cationic antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8856-8861.
32. **Hanusová, L., Čurn, V. (2007):** Inhibitory proteas v hlíze bramboru. *Chemické listy* 101: 536-541.
33. **Hass, G. M., Ako, H., Grahn, D. T., Neurath, H. (1976):** Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. The effects of chemical modifications on inhibitory activity. *Biochemistry.* 15(1): 93-100.
34. **Heitefuss, R., Williams, P. H. (eds) (1976) :** Physiological plant pathology. Encyclopedia of plant physiology. New series, Vol. 4. *Springer-Verlag*, New York.
35. **Heřmanová, V., Bárta, J., Čurn, V. (2006):** Antifugální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chemické listy* 100: 495-500.
36. **Horsfall, J. G., Cowling, E. B. (eds) (1980):** Plant disease: an advanced treatise. Vol. V. How plants defend themselves. *Academic Press*, New York.
37. **Hraška, M., Rakouský, S., Čurn, V. (2006):** Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenosi rostlin. *Chem. Listy* 100: 501-507.
38. **Huang, C., Ma, W.-Y., Ryan, C. A., Dong, Z. (1997):** Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, c-jun Nterminal kinases, and P38 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 11957-11962.
39. **Jin, Z., Yang, Y. X., Choi, J. Y., Shinde, P. L., Yoon, S. Y., Hahn, T. W., Lim, H. T., Park, Y. K., Hahm, K. S., Joo, J. W., Chae, B. J. (2008):** Effects of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) protein having antimicrobial activity on the

growth performance, and intestinal microflora and morphology in weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 140: 139-154.

40. **Jongsma, M. A. (1995):** The resistance of insect to plant proteinase inhibitors. Centre for Plant Breeding and Reproduction. Wageningen. Wageningen university.
41. **Kalač, P. (2008):** Houby: víme, co jíme?. České Budějovice: Dona, 114 s. ISBN 978-80-7322-112-6.
42. **Kennedy, A. R. (1998):** Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 78: 167-209.
43. **Kim, J., Park, S., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J., Hahm, K., Park, Y. (2009):** Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2860-2872.
44. **Kůdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebeda, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, E., Veselý, D. (1989):** Obecná fytopatologie. 1. Praha: Academia. 388 s. ISBN 80-200-0156-5.
45. **Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L. (2002):** Rostlinolékařská bakteriologie. Vyd. 1. Praha: Academia, 347 s. ISBN 80-200-0899-3.
46. **Krizaj, I., Drobnic-Kosorok, M., Brzin, J., Jerala, R., Turk, V. (1993):** The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Lett.* 333: 15-20.
47. **Lawrence, P. K., Koundal, K. R. (2002):** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *J. Biotech.* 5 (1): 93-109.
48. **Lee, L., Hannapel, D., Mignery, G., Shumway, J., Park, W. (1983):** Control of tuber protein synthesis in potato. In: Golberg R. B. (ed). *Plant Molecular Biology*, pp. 355-365, *UNCLA Symp.*, Alan R. Liss, New York.
49. **Lee, M. C. S., Scanlon, M. J., Craik, D. J., Anderson, M. A. (1999):** A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6: 526-530.
50. **Lindner, K., Jashik, S., Korpaczy, I. (1960):** Amino acid composition and biological value of potato protein fractions. *Qual Plant Mater Veg* 7: 289-294.
51. **Liu, Y.-W.; Han, C.-H.; Lee, M.-H.; Hsu, F.,L.; Hou, W.-C. (2003):** Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum L.*) exhibits antioxidant activity *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4389-4393.

- 52. Lorenc, F. (2011):** Rostlinné peptidy a proteiny s antimikrobiální aktivitou a možnosti jejich využití. (Diplomová práce), České Budějovice : Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 46 s.
- 53. Macrae, A.R., Visicchion, J.E., Lanot, A. (1998):** Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols. *JAACS* 75: 1489-1494.
- 54. Mariscal, A.; Lopez-Gigosos, M. L.; Carnero-Varo, M.; Fernandez-Crehuet, J. (2009):** Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 773-783.
- 55. Melville, J. C., Ryan, C. A (1972):** Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: Large scale preparation and characterization of its subunit components. *J. Biol. Chem.* 247: 3443-3453.
- 56. Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Muñoz, F. F., Daleo, G. R., Guevara, M. G. (2006):** Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (*StAPs*) involves membrane permeabilization. *Microbiology* 152: 2039-2047.
- 57. Mignery, G.A., Pikaard, C.S., Hannapel, D.J., Park, W. D. (1984):** Isolation and sequence analysis of cDNA for the major tuber protein. *Nucleic Acids Res.* 12: 7987-8000.
- 58. Neubauerová, T., Macková, M., Macek, T., Koutek, B. (2009):** Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy* 103: 460-468.
- 59. Ngai, P. H., Ng, T. B. (2004):** A napin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, and antibacterial activities. *Peptides* 25: 171-176.
- 60. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000):** Investigation of the Almar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- 61. Park, S. W., Lawrence, C. B., Linden, J. C., Vivanco, J.M. (2002):** Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of pokeweed and its mechanism of secretion from roots. *Plant Physiol.* 130: 164-178.
- 62. Park, Y., Choi, B. H., Klak, J-S., Kang, Ch-W., Lim, H-T., Cheong, H-S., Hahm, K-S. (2005):** Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor from Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *J. Agric. Food Chem.* 53: 6491-6496.
- 63. Peyer, C., Boney, P., Staudacher, E. (2004):** Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *BBA-Proteins Proteom* 1672: 27-35.

- 64. Pots, A. M. (1999):** Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 123 s.
- 65. Pouvreau, L. (2004):** Occurrence of physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 157 s.
- 66. Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., Broek van den, L. A. M., Koningsveld van, G. A., Voragen, A. G. J. (2001):** Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2864-2874.
- 67. Pouvreau, L., Gruppen, H., van Koningsveld, G. A., van den Broek, L. A. M., Voragen, A. G. J. (2003):** The most abundant protease inhibitor in potato tuber (cv. Elkana) is a protease inhibitor from the Kunitz family. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5001-5005.
- 68. Procházka, S., Macháčková, I. (1998):** Fyziologie rostlin. Praha: Academia. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- 69. Racusen, D., Foote, M. (1980):** A major soluble glycoprotein of potato. *J. Food Biochem.* 4: 43-52.
- 70. Racusen, D., Weller, D. L. (1984):** Molecular weight of patatin, a major potato tuber protein. *J. Food Biochem.* 8: 103-107.
- 71. Racusen, D. (1984):** Lipid acyl hydrolase of patatin. *Canadian Journal of Botany.* 62: 1640-1644.
- 72. Racusen, D. (1986):** Esterase specificity of patatin from two potato cultivars. *Canadian Journal of Botany.* 64: 2104-2106.
- 73. Revina, T. A., Gerasimova, N. G., Kladnitskaya, G. V., Chalenko, G. I., Valueva, T. A. (2008):** Effect of proteinaceous proteinase inhibitors from potato tubers on the growth and development of phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 44 (1): 89-92.
- 74. Richardson, M., Cossins, L. (1974):** Chymotryptic inhibitor I from potatoes: the amino acid sequences of subunits B, C and D. *FEBS Lett.* 45: 11-13.
- 75. Richardson, M. (1991):** Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochem.* 5: 259-305.

- 76. Ritonja, A., Krizaj, J., Mesko, P., Kopitar, M., Lucovnik, P., Strukelj, B., Pungecar, J., Buttle, D. J., Barrett, A. J., Turk, V. (1990):** The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267: 13-15.
- 77. Rosahl, S., Schmidt, R., Schell, J., Willmitzer, L. (1986):** Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tubers. *Mol. Gen. Genet.* 203: 214-220.
- 78. Rotem, S., Mor, A. (2009):** Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 1582-1592.
- 79. Ryan, C. A. (1990):** *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 425.
- 80. Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007):** Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321-324.
- 81. Seibles, T. S. (1979):** Studies of potato proteins. *Am. Potato J.* 56: 415-425.
- 82. Selitrennikoff, C. P. (2001):** Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883-2894.
- 83. Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. (1996):** A cytosolic phospholipase A₂ from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiology* 37: 347-353.
- 84. Senda, K., Doke, N., Kawakita, K. (1998):** Effect of mastoparan on phospholipase A₂ activity in potato tubers treated with fungal elicitor. *Plant Cell Physiol.* 39: 1080-1086.
- 85. Shand, R. F., Leyva, K. J. (2008):** Archaeal Antimicrobials: An Undiscovered Country. In Blum, P. (ed.). *Archaea: new models for prokaryotic biology.* Caister Academic Press, Norfolk, UK.. 233-245 s.
- 86. Shapiro, A. L., Vinuela, E., Maizel, J. V. (1967):** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 815-820.
- 87. Shewry, P. R. (2003):** *Annals of Botany* 91: 755-762.
- 88. Shiloh, M., Ruan, J., Nathan, C. (1997):** Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay. *Infect Immun.* 65: 3193-3198.

- 89. Sonnewald, U., Sturm, A., Chrispeels, M. J., Willmitzer, L. (1989):** Targeting and glycosilation of patatin, the major tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 179: 171-180.
- 90. Strickland, J. A., Orr, G. L., Walsh, T. A. (1995):** Inhibition of *Diabrotica* larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiol.* 109: 667-674.
- 91. Suh, S.-G., Peterson, J. E., Stiekema, W.J., Hannapel, D. J. (1990):** Purification and characterisation of the 22-kilodalton potato tuber proteins. *Plant Physiol* 373: 477-482.
- 92. Terras, F. R. (1994):** Dissertation. K. U. Leuven, Belgium.
- 93. Tonón, C., Daleo, G., Oliva, C. (2001):** An acidic beta-1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiol. Bioch.* 39 (10): 849-854.
- 94. Twigg, R. S. (1945):** Oxidation-reduction aspects of Resazurin. *Nature* 155: 401-402.
- 95. Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya, G. V., Mosolov V. V., Mentele, P. (1999):** Primary Structure of a 21-kD Protein from Potato Tubers. *Biochemistry (Moscow)* 64: 1489 – 1498.
- 96. Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya G. V., Mosolov V. V. (1998):** *FEBS Lett.* 426: 131-134.
- 97. Walsh, T. A., Twitchell, W. P. (1991):** Two kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* 97: 15-18.
- 98. Weber K., Osborn M. (1969):** The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- 99. Wu, J., Haard, N. F. (2000):** Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated potato plants. *Comp. Biochem. Physiol.* 127: 209-220.
- 100. Ye, X. Y., Wang, H. X., Ng, T. B. (1999):** First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 130-134.
- 101. Yeaman, M. R., Yount, N. Y. (2003):** Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.
- 102. Zasloff, M. (2002):** AMPs of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.