

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

KATEDRA ROSTLINNÉ VÝROBY A AGROEKOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Hodnocení antifungální aktivity vybraných
peptidových frakcí izolovaných z hlíz brambor vůči
houbám rodu *Fusarium* *sp.***

**autor: Jana Reiserová
vedoucí práce: doc. Ing. Jan Bárta Ph.D.**

2012

Anotace

Tématem bakalářské práce je hodnocení antifungální aktivity vybraných peptidových frakcí izolovaných z hlíz brambor vůči houbám rodu *Fusarium* *sup.* Cílem teoretické části této práce je zpracování přehledu proteinů izolovaných z bramborové hlízy (*Solanum tuberosum* L.), krátký popis rodu *Fusarium*, druhů *F. solani* a *F. oxysporum*, popis základních mechanismů obrany rostlin proti houbám a přehled antifungálních proteinů. V experimentální části bude hodnocena antifungální aktivita u vybraných proteinových frakcí z hlízy *Solanum tuberosum* L. vůči *F. solani* a *F. oxysporum*, které byly připraveny pomocí separačních technik.

Klíčová slova

Antifungální proteiny, *Fusarium*, bramborové proteiny, inhibitory proteas, patatin

Abstract

The bachelor thesis deals with evaluation of antifungal activity of selected peptide fractions isolated from potato tuber against *Fusarium* spp. fungi. Literature review contains information about isolated potato tuber proteins from *Solanum tuberosum* L., short description of genus *Fusarium*, species *F. solani* and *F. oxysporum*, information about plant defense mechanisms against fungi and at least information about antifungal proteins. The experimental part deals with evaluation of antifungal activity of selected peptide fractions from potato tuber of *Solanum tuberosum* L. against *F. solani* and *F. oxysporum* which were prepared by separation techniques.

Key words

Antifungal proteins, *Fusarium*, potato proteins, protease inhibitors, patatin

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2012

Jana Reiserová

.....

Poděkování

Za pomoc při vypracování mé bakalářské práce děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D., a odborné konzultantce Ing. Veronice Bártové, Ph.D. a dále Ing. Andreje Kamenové za vedení praktické části bakalářské práce.

Obsah

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
2.1	HLÍZOVÉ PROTEINY BRAMBORU (<i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.)	12
2.1.1	<i>Klasifikace hlízových proteinů</i>	12
2.1.2	<i>Patatin</i>	12
2.1.3	<i>Inhibitory proteas</i>	15
2.1.4	<i>Ostatní proteiny hlíz brambor</i>	18
2.2	FUSARIUM	19
2.2.1	<i>Charakteristika</i>	19
2.2.2	<i>Taxonomie</i>	19
2.2.3	<i>Rozmnožování a morfologie</i>	19
2.2.4	<i>Mykotoxiny</i>	20
2.2.5	<i>Suchá hniloba bramborových hlíz</i>	21
2.2.6	<i>Fusarium solani</i>	22
2.2.7	<i>Fusarium oxysporum</i>	23
2.3	OBRANNÉ MECHANISMY ROSTLIN VŮČI HOUBÁM	24
2.3.1	<i>Stres</i>	24
2.3.2	<i>Rozdělení obranných mechanismů</i>	25
2.3.3	<i>Interakce s patogenními organismy (houby)</i>	26
2.3.4	<i>Neproteinové antifungální látky</i>	28
2.3.5	<i>Antifungální proteiny</i>	28
2.3.6	<i>Proteiny PR-2</i>	30
2.3.7	<i>Proteiny PR-4</i>	30
2.3.8	<i>Defensiny</i>	31
2.3.9	<i>Inhibitory proteas</i>	31
2.3.10	<i>Ostatní antifungální proteiny</i>	32
3	CÍLE PRÁCE	33
4	MATERIÁL A METODY	34
4.1	HLÍZY BRAMBORU (<i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.)	34
4.2	HOUBY	34
4.3	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA	34
4.4	PŘÍPRAVA PROTEINU	36
4.5	SDS-PAGE	37
4.6	EXPERIMENT	39
5	VÝSLEDKY	41
5.1	SDS-PAGE	41
5.2	VYHODNOCENÍ PLOCHY INHIBICE RADIÁLNÍHO RŮSTU	42
5.2.1	<i>Vyhodnocení Fusarium solani kmen 8079</i>	44
5.2.2	<i>Vyhodnocení Fusarium solani kmen 8014</i>	45
5.2.3	<i>Vyhodnocení Fusarium solani kmen 1036</i>	46
5.2.4	<i>Vyhodnocení Fusarium oxysporum kmen F-65</i>	47

5.2.5	<i>Vyhodnocení Fusarium oxysporum kmen 17</i>	48
6	DISKUZE	49
7	ZÁVĚR	50
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
10	PŘÍLOHA 1	57

1 Úvod

Hlízy bramboru (*Solanum tuberosum*) jsou velmi významnou zemědělskou plodinou, která slouží především k výživě lidstva, jako surovina pro škrobářenský průmysl a jako krmivo pro hospodářská zvířata (Bárta & Čurn, 2004). Hlízy obsahují vodu, minerály, vitamíny, sacharidy a nezanedbatelné množství proteinů. Proto jsou ideální pro výživu člověka, ale zároveň jsou i živnou půdou pro patogenní houby. Například pro houby rodu *Fusarium*, které mohou napadat poškozené hlízy vyvolat řadu chorob. V napadené hlíze degradují proteiny, sacharidy, vitamíny a syntetizují sekundární metabolity – mykotoxiny, které jsou jedovaté pro člověka i pro hospodářská zvířata.

Napadení patogenem vyvolá v rostlině obranné reakce, které zpomalují, až inhibují růst patogenního organismu. V rostlinách se vyskytuje mnoho látek, které mohou potlačovat růst patogenů nebo jej usmrtit. Například antifungální proteiny.

Tyto proteiny lze separačními technikami získat z bramborové šťávy, z vedlejších produktů, které produkuje škrobářenský průmysl. Bramborová šťáva v sušině obsahuje až 27 % proteinů a 4 % peptidů (Bárta & Bártová, 2007). Tento fakt by mohl pomoci efektivněji využívat „odpad“ ze škrobářenského průmyslu a dalším studiem potenciálu těchto bílkovin docílit zařazení do nových biotechnologických aplikací.

Hlízové bílkoviny jsou rozděleny do 3 skupin: patatin, inhibitory proteas a ostatní bramborové bílkoviny (Pots, 1999). Antifungální účinek byl prokázán pouze u některých skupin inhibitorů proteas jako například u bramborového inhibitoru proteas I a II, u serinových inhibitorů proteas a u inhibitorů proteas Kunitzova typu (Kim et al., 2009; Sprenskaya et al., 2006).

2 LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Hlízové proteiny bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Brambor hlíznatý je celosvětově významnou plodinou, jejíž hlízy slouží k výživě lidstva a pro průmysl (Bárta & Čurn, 2004). Hlízu tvoří průměrně 75% vody a sušina (Hanusová & Čurn, 2006). Sušina obsahuje mimo proteiny další látky jako jsou například škrob (hlavní zásobní látka), vitamín C a jiné neproteinové dusičnany (volné aminokyseliny, amidy, asparagin, glutamin). Obsah dusíkatých látek v sušině hlízy kolísá vlivem genotypu a prostředí ve značném rozpětí od 34 do 70% (Bárta & Čurn, 2004).

2.1.1 Klasifikace hlízových proteinů

Dříve se uvádělo rozdělení podle rozpustnosti proteinů na globulinovou, albuminovou, prolaminovou a glutelinovou frakci. Názory na podíl frakcí se mezi autory starších vědeckých publikací velmi liší. Dnes se využívají techniky zakládající se na elektroforetických metodách jako je PAGE, SGE, IEF, 2D – PAGE a SDS - PAGE. Podle SDS – PAGE bylo definováno dnes využívané rozdělení na tři skupiny: patatin, inhibitory proteas a ostatní proteiny (Bárta & Bártová, 2007; Pots, 1999).

2.1.2 Patatin

Patatin se za optimálních podmínek, kdy rostlina vytváří hlízy, vyskytuje ve větším množství jen v hlízách. V listech, kořenech a stoncích se za optimálních podmínek vyskytuje pouze ve stopovém množství (Bárta & Bártová, 2007; Mignery et al., 1988). Proteiny patatinové skupiny se pravděpodobně vyskytují ve všech odrůdách brambor, včetně příbuzných diploidů ze skupiny *Andigena* a *Phureja* (Bárta & Bártová, 2007; Lee et al., 1983).

Triviální označení patatin vzniklo roku 1980, když pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie byla prvně izolována skupina patatinových proteinů (Bárta & Bártová, 2007; Racusen & Foote 1980). Patatin představuje skupinu imunologicky shodných glykoproteinových isoformů o molekulové hmotnosti 40 – 43 (45) kDa a prokázanou lipidacylhydrolasovou aktivitou (Bárta & Bártová, 2007; Pots, 1999; Dennis & Galliard 1974; Lee et al., 1983). Je pravděpodobně syntetizován jako prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa a následně je upraven odštěpením signálního peptidu, který je tvořen 23 aminokyselinami (Bárta & Bártová, 2007; Mignery et al., 1984). Různá molekulová hmotnost je způsobena různými počty glykosylací v kombinaci s mutací v primární

sekvenci patatinu (Bárta & Bártová, 2008). V nativní formě je považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa respektive 88 kDa (Bárta & Bártová, 2007; Racusen & Weller, 1984; Racusen, 1984). Izoelektrický bod patatinového komplexu se nachází v rozmezí pH 4,6 až 5,2 (Pots, 1999; Bárta & Bártová, 2007).

Proteiny patatinového komplexu zaujímají 20 – 40 % všech extrahovatelných hlízových proteinů bramboru (Bárta & Bártová, 2007; Macrae et al., 1998). V hlíze je patatin lokalizován v centrálních vakuolách parenchymatických buněk (Bárta & Bártová, 2007; Sonnewald et al., 1989). Tato skutečnost spolu s vysokým zastoupením patatinu v hlíze je důvodem, proč se proteinům patatinového komplexu přisuzuje zásobní funkce (Bárta & Bártová, 2007; Rosahl et al., 1986). Ale vzhledem ke specifické enzymatické aktivitě byla vyslovena hypotéza, že zásobní funkce není jedinou funkcí proteinů patatinového komplexu (Bárta & Čurn, 2004; Bárta & Bártová, 2007).

Enzymová aktivita patatinových proteinů a jejich funkce

Patatin je považován za zásobní protein. Při dlouhodobém skladování (až 2,5 roku), bylo zjištěno, že tyto patatinové frakce během skladování postupně vymizely (Bárta & Bártová, 2007; Kumar et al., 1999; Pots et al., 1999). Předpokládá se, že zásobní funkce nebude jediná fyziologická funkce patatinu (Bárta & Čurn, 2004; Bárta & Bártová, 2007).

Aktivita nescifické lipidacylhydrolasy (LAH aktivita)

Byla objevena brzy po začátku výzkumu patatinu. Vykazuje esterasovou aktivitu pro tvorbu voskových esterů i pro deacylace lipidů (Bárta & Bártová, 2007; Dennis & Galliard, 1974). Tento enzym vykazuje vysokou aktivitu vůči substrátům, jako jsou fosfolipidy, monoacylglyceroly a p-nitrofenylové estery karboxylových sloučenin. Střední aktivitu vykazuje vůči galaktolipidům a negativní aktivitu vůči di-acyl a tri-acyl glycerolům (Bárta & Bártová, 2007; Andrews et al., 1988). Na genotypové (tj. odrůdové) úrovni byli zjištěny různé aktivity LAH (Bárta & Bártová, 2007). Byly vysloveny hypotézy týkající se fyziologické role LAH aktivity patatinu v obranném systému proti patogenům. Podle první teorie dochází při poškození buňky napadené rostliny k uvolňování mastných kyselin prostřednictvím LAH aktivity. Mastné kyseliny jsou oxidovány lipooxydasami a to vede ke vzniku cytotoxických oxidovaných mastných kyselin. LAH aktivita má také za následek tvorbu ve vodě nerozpustných vosků, které zabraňují poškození buněk rostliny, vniknutí patogenu a jeho šíření

v rostlině (Bárta & Bártová, 2007; Pots, 1999). Druhá teorie uvádí, že LAH aktivita patatinu působí na patogeny přímou inhibicí, pravděpodobně dochází k narušení integrity buněčné stěny (Bárta & Bártová, 2007; Strickland et al., 1995). Teorie nebyly zatím prokázány. LAH aktivita je mezi odrůdami různá, což je možná příčina rezistence některých odrůd vůči určitým patogenům (Bárta & Bártová, 2007). Podle toho předpokladu, by měly být odrůdy s nízkou LAH aktivitou méně odolné než ty s vyšší LAH aktivitou patatinu (Bárta & Bártová, 2007; Pots, 1999). Tato teorie však nebyla v praxi zatím potvrzena (Bárta & Bártová, 2007).

Aktivita cytosolové fosfolipasy A₁ a A₂ (PLA₁ a PLA₂)

Aktivita fosfolipasy A₂ (PLA₂) je vyšší než PLA₁, proto je patatin označen jako enzym s aktivitou PLA₂. PLA₂ je lipolytický enzym, který katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů. Aktivita PLA₂ závisí na hodnotě pH prostředí, při hodnotě pH 7,5 až 9,0 byla aktivita nejvyšší. Při poklesu pH pod 7 byla aktivita PLA₂ minimální. Z tohoto vyplývá, že je aktivita enzymu závislá na jeho umístění v buňce, vakuola má kyselé prostředí – enzym neaktivní (Bárta & Bártová, 2007). Aktivita PLA₂ je indukována přítomností Ca²⁺ a kinasou (Bárta & Bártová, 2007; Kawakita et al., 1993).

Fosfolipasy jsou schopné odštěpovat z membránových fosfolipidů nenasycené mastné kyseliny. Uvolněné mastné kyseliny slouží jako signální látky vedoucí k expresi obranných genů (Bárta & Bártová, 2007). PLA₂ se účastní na signální transdukci, která vyvolává rezistentní reakci v buňkách bramboru při napadení (inokulací) houbou *Phytophthora infestans* (Bárta & Bártová, 2007; Senda et al., 1998). Při této inokulaci jsou aktivovány lipooxygenasy vázané v cytoplazmatické membráně a také intracelulární lipidperoxidasy, které se podílejí na produkci rishitinu - fytoalexinu brambor (Bárta & Bártová, 2007; Doke & Nishimura, 1988).

Aktivita β-1,2-xylosidasy

Aktivita β-1,2 xylosidasy je optimální při pH 4 až 4,5 a při teplotě 50°C. β-1,2 xylosidasa má schopnost uvolňovat z N-glykanů xylosidasové molekuly vázané β-1,2 vazbou na β-manosu (Bárta & Bártová, 2007). Funkce tohoto enzymu zatím není známa, ale byla vyslovena hypotéza o možném vztahu β-1,2 xylosidasy s obranným systémem hlíz bramboru (Bárta & Bártová, 2007; Peyer et al., 2004).

Aktivita kyselý β -1,3-glukanasy (GLU-40)

Rostlinné enzymy s glukanasovou aktivitou jsou řazeny mezi proteiny, jejichž výskyt je spojen s obranou rostliny vůči patogenům (PR-proteiny). Chytnasy a β -1,3-glukanasy jsou schopné vázat se na buněčnou stěnu hub (z chitinu a β -1,3 glukanu) a degradovat ji. Tento způsob vede k omezení nebo úplné inhibici růstu houbových organismů (Bárta & Bártová, 2007). Antifungální aktivita β -1,3-glukanasy byla prokázána vůči druhu *Phytophthora infestans*, enzym byl schopen inhibovat klíčení sporangii (Bárta & Bártová, 2007; Sharma et al., 2004).

2.1.3 Inhibitory proteas

Inhibitory proteas představují přibližně 20 – 30 % a v odrůdě Elkana až 50 % proteinů z celkového množství v bramborové šťávě (Bárta & Bártová, 2007; Povreau, 2004). Rostlinné inhibitory proteas jsou charakterizovány jako proteiny mající schopnost inhibovat proteolytické enzymy mikroorganismů a hub, ale rostlinné proteasy jsou inhibovány jen výjimečně (Bárta & Bártová, 2007). Významný podíl mají také na regulaci mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti (Hraška et al., 2006).

Jsou to proteiny, které se významně podílí na obraně rostliny vůči napadení hmyzem, patogeny (Bárta & Bártová, 2007; Jongsma, 1995). Nárůst koncentrace inhibitorů je pozorován jak v místě napadení, tak i v celé rostlině, působí tedy systémově (Hanusová & Čurn, 2006).

Hlíza obsahuje vysoké množství těchto proteinů i bez předchozí indukce poraněním či patogenem, proto jsou považovány za zásobní látky (Bárta & Bártová, 2007; Hanusová & Čurn, 2006; Povreau, 2004). Ale je velmi pravděpodobné, že tento protein má i jiné fyziologické funkce (Bárta & Bártová, 2007).

Dělení inhibitorů proteas

Inhibitory proteas jsou klasifikovány na základě typů enzymů, které inhibují. Následná klasifikace vychází z kompozice aktivního místa proteas, které inhibují. Na základě tohoto principu je dělíme například jako: serinové (serin či histidin v aktivním místě proteasy); cysteinové (cystein v aktivním místě); aspartátové (aspartátová skupina v aktivním místě); metaloproteasové (s kovovým iontem v aktivním místě) (Bárta & Bártová, 2007; Jongsma, 1995). Dělení do skupin může být také komplikováno strukturou aktivního místa či homologii sekvencí (Bárta & Bártová, 2007).

Pots (1999); Bárta & Bártová (2007) dělí inhibitory proteas do tří tříd. První třídu tvoří bramborový inhibitor I (PI-1), což je inhibitor serinových proteas. Tento protein je pentamer, složený z isoinhibitorových promotorových podjednotek. Jeho celková molekulová hmotnost je 40 kDa. Představitelem druhé třídy je bramborový inhibitor II (PI-2). Tato skupina je tvořena dimery inhibitorů serinových proteas. Obě podjednotky se chovají jako jednodoménný protein. Proteiny o molekulové hmotnosti 20 až 22 kDa jsou členy třetí třídy. Tato třída se dále dělí do 4 odlišných tříd: 1) inhibitory proteas Kunitzova typu, 2) inhibitory cysteinových proteas, 3) inhibitory aspartátových proteas a 4) inhibitor karboxypeptidasy. Všechny inhibitory proteas zařazené do této třídy jsou monomery. Liší se typem proteasy, kterou inhibují, a počtem cysteinových zbytků na podjednotku (Hanusová & Čurn, 2006).

Povreau et al. (2001) dělí inhibitory proteas do 7 skupin. Dělení se zakládá na rozdílu molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstku v molekule. Podle těchto kritérií lze rozdělit inhibitory proteas do následujících skupin: inhibitor I z bramboru (PI-1), inhibitor II z bramboru (PI-2), inhibitor karboxypeptidasy z bramboru (PCI), inhibitor aspartátových proteas z bramboru (PAPI), inhibitor cysteinových proteas z bramboru (PCPI), inhibitor proteas Kunitzova typu z bramboru (PKPI) a ostatní inhibitory serinových proteas (OSPI) (Hanusová & Čurn, 2006; Bárta & Bártová, 2007). Nejvíce zastoupenými skupinami inhibitorů jsou PI-2 a PCPI, které představují 22 a 12 % ze všech proteinů v hlíze bramboru (Hanusová & Čurn, 2006).

Bramborový inhibitor I (PI-1)

Je to serinový inhibitor proteas. Skládá se z pěti podjednotek (pentamer) o velikosti 7,7 – 7,9 kDa. Představují 4,5 % z celkových proteinů ze šťávy brambor. Zatím bylo objeveno 8 forem této třídy. Hodnota isoelektrického bodu se pohybuje v rozmezí pH 5,1 až 7,8. Vykazují trypsinovou, chymotrypsinovou aktivitu, antimikrobiální a insekticidní účinky pro možné využití v genovém inženýrství (Bárta & Bártová, 2007).

Bramborový inhibitor II (PI-2)

Je to serinový inhibitor proteas, který se skládá ze dvou podjednotek (dimer) o velikosti 10,2 kDa. Podjednotky jsou spojeny disulfidickými můstky (Bárta & Bártová, 2007; Lee et al., 1999). Ve šťávě brambor je zastoupena 7 formami, které představují 22 % z celkových proteinů. Hodnota isoelektrického bodu je pH 5,5 až 6,9. Vykazují

trypsinovou, chymotrypsinovou aktivitu, antimikrobiální a insekticidní účinky pro možné využití v genovém inženýrství (Bárta & Bártová, 2007).

Bramborový cysteinový inhibitor (PCPI)

Skupina představuje 12 % z celkových proteinů ze šťávy brambor (Povreau et al., 2001). Tato skupina se skládá z 9 různých inhibitorů o velikosti 20,1 – 22,8 kDa a o hodnotě isoelektrického bodu 5,8 - 9. Jsou to inhibitory cysteinových proteas (papain). Vykazují aktivitu vůči trypsinu a chymotrypsinu (Bárta & Bártová, 2007).

Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI)

Skládá se z 6 skupin různých inhibitorů, představují 6 % z celkových proteinů ze šťávy brambor. Hodnota isoelektrického bodu se pohybuje v rozmezí pH 6,2 – 8,7 (Bárta & Bártová, 2007). Velikost se pohybuje v rozmezí 19,9 – 22 kDa. Vykazují inhibiční aktivitu proteas kathepsinu D, chymotrypsinovou a trypsinovou aktivitu (Bárta & Bártová, 2007; Povreau et al., 2001).

Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu (PKPI)

Jsou složeny ze dvou proteinů o molekulové hmotnosti 20,2 kDa. Hodnota isoelektrického bodu je v rozmezí pH 8 až 9. Přestavují 4 % z celkových extrahovatelných proteinů ze šťávy brambor. Mají trypsinovou a chymotrypsinovou aktivitu. Mohou být detekovány v poškozených i nepoškozených nadzemních částech rostliny. Byl popsán inhibiční vliv na růst a vývoj patogenní houby *Fusarium culmorum* (Bárta & Bártová, 2007).

Ostatní serinové inhibitory proteas (OSPI)

Zahrnují dvě skupiny inhibitorů proteas, které představují 1,5 % z celkových proteinů ze šťávy brambor. Molekulová hmotnost první skupiny je 21 kDa a druhé skupiny je 21,8 kDa a jejich isoelektrický bod je v rozpětí hodnot pH 7,5 až 8,8 (Bárta & Bártová, 2007). Vykazují aktivitu proti elastáze, trypsinovou a chymotrypsinovou aktivitu (Povreau et al., 2001).

Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas (PCI)

Skládá se z jediného zástupce o velikosti 4,3 kDa a představuje 1 % z celkových extrahovatelných proteinů ze šťávy brambor. Vykazuje aktivitu vůči karboxypeptidase A. Specifickou vlastností těchto proteinů je odolnost vůči teple, která je způsobena přítomností tří disulfidických můstků (Bárta & Bártová, 2007).

2.1.4 Ostatní proteiny hlíz brambor

Podle Pots (1999); Bárty & Bártové (2007) jsou do ostatních proteinů řazeny proteiny, které nelze na základě imunologické odpovědi řadit k patatinu nebo nemají schopnost inhibovat proteasy. Ostatní proteiny mají molekulovou hmotnost přibližně nad 45 kDa. Do této skupiny jsou zařazovány proteiny jako je hlízový lektin, polynoloxidas (60 a 69 kDa), protein kinasa, enzymy které se účastní na syntéze škrobu a fosforylasové isoenzymy (Bárta & Bártová, 2007; Koningsveld, 2001).

Bramborový lektin je chimérický, na chitin vázající se protein, jenž se skládá z lektinové domény a glykoproteinové domény s hydroxyprolinem (Bárta & Bártová, 2007). Tyto dvě domény jsou propojeny 60 aminokyselinami (Bárta & Bártová, 2007; Dammne et al., 2004). Molekulová hmotnost lektinu v nativním stavu je 100 kDa (50 % tvoří sacharid). Na larvách *Meltingethes Aenus* byla testována biologická aktivita lektinu, účel tohoto testu bylo nalézt látky, které by mohli s využitím genového inženýrství způsobit rezistenci proti zmíněnému škůdci. Bramborový lektin má schopnost redukovat růst larev (Bárta & Bártová, 2007; Ahman & Melander, 2003).

2.2 Fusarium

2.2.1 Charakteristika

Rod *Fusarium* zahrnuje velké množství hub, které mohou být patogenní pro řadu rostlin, způsobují nemoci mnoha zemědělských plodin a mohou být škodlivé pro člověka a zvířata. Mnoho z nich syntetizuje celou řadu biologicky aktivních sekundárních metabolitů (např. mykotoxiny) s mimořádnou chemickou rozmanitostí. Fusariové mykotoxiny mohou být škodlivé pro rostliny, a to je spojeno s rakovinou a dalšími závažnými onemocněními u lidí a hospodářských zvířat, které zkonsumovali kontaminovanou potravu (Moretti, 2009).

2.2.2 Taxonomie

Askomycety jsou nejpočetnější všeobecně rozšířenou skupinou hub. Do této skupiny patří saprotrofové, parazité, mykorhizní houby a lichenizované houby (Sedlářová & Vašutová, 2004). Člení se na cca 40 řádů podle typu plodnic a ontogeneze plodnic. Od tohoto typu zařazení se postupně ustupuje a podle molekulárních znaků vznikají nová třídění, jako je v tab. 1 (Luginbuhl, 2010). Jednotlivé druhy rodu *Fusarium* jsou rozlišovány podle morfologie, např. tvaru makrokonidií a přítomnosti chlamydospor (Moretti, 2009).

Tab. 1: Taxonomie rodu *Fusarium* (Luginbuhl, 2010)

Říše	Houby
Kmen	<i>Ascomycota</i>
Podkmen	<i>Pezizomycotina</i>
Třída	<u><i>Sordariomycetes</i></u>
Podtřída	<i>Hypocreomycetidae</i>
Řád	<i>Hypocreales</i>
Čeleď	<u><i>Nectriaceae</i></u>
Rod	<u><i>Fusarium</i></u>

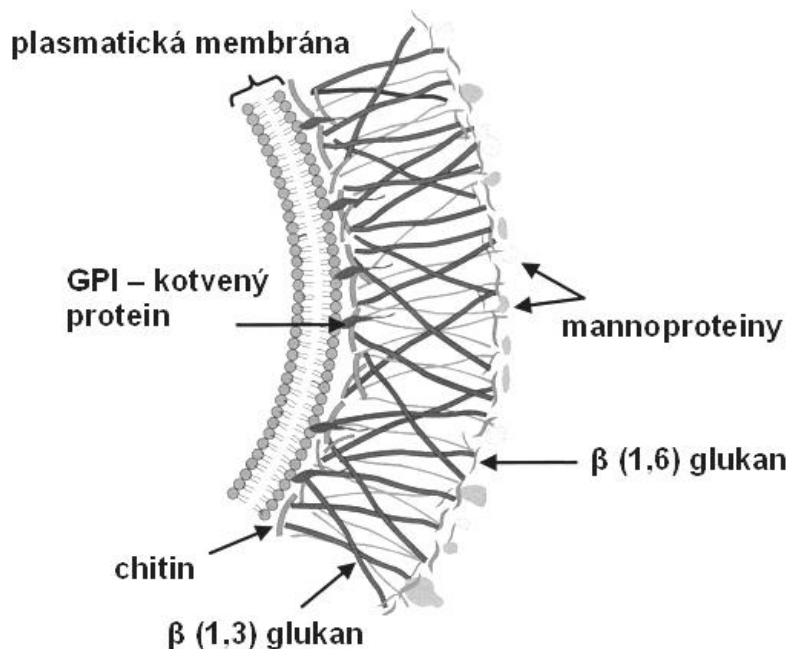
2.2.3 Rozmnožování a morfologie

Askomycety tvoří septované mycelium s jednoduchými póry.

Houby tohoto rodu vyrábí tři druhy spor: makrokonidie, mikrokonidie a chlamydospory, které vyrůstají na tzv. konidioforech. Septované makrokonidie mohou být produkovány na monofialidách a polyfialidách nebo také na krátkých specializovaných monofialidách tzv. sporodochia. Fialidy jsou buňky konidioforu s unikátními póry (monofialidy mají jeden pór, polyfialidy mají více pórů). Makrokonidie se velmi liší tvarem a velikostí, jsou vyráběny ve shlucích nebo řetězcích

na fialidách. Clamydospory mají velmi odolnou konstrukci se zesílenými stěnami a vysokým obsahem tuku, mohou se tvořit ve středu hyf nebo na jejich konci (Moretti, 2009).

Buněčná stěna buněk mycelia tvoří hlavně chitin a polyglukan (Sedlářová & Vašutová, 2004). Složení buněčné stěny hub je velmi rozdílné od složení stěny rostlinných buněk a této výrazné odlišnosti lze využít v aplikaci antifungálních látek, které se zaměřují pouze na buněčnou stěnu hub. Schéma typické buněčné stěny je znázorněno na obr. 1. Je důležité si uvědomit, že houby mají značný vnitřní tlak (turgor), který při sebemenším poškození buněčné stěny může vést k lýze houbové buňky (Selitrennikoff, 2001).



Obr. 1: Schéma stavby buněčné stěny hub (Heřmanová et al., 2006)

2.2.4 Mykotoxiny

Rod *Fusarium* produkuje sekundární metabolity - mykotoxiny. Substráty jsou obvykle obiloviny a brambory. Tyto metabolity jsou jedovaté pro zvířata (i pro člověka), proto je nutné sledovat jejich výskyt v potravinách. V kontaminovaných potravinách je obvykle nacházíme v kombinaci, která působí horší poškození než jednotlivé mykotoxiny. Rozlišujeme tři hlavní skupiny fusariových mykotoxinů: trichoteceny, fumonisiny, zearalenon.

Trichoteceny

Trichoteceny tvoří rodiny úzce souvisejících chemických sloučenin, nejčastěji vyskytující se jsou deoxynivalenol, nivanelol a T2 toxin (Desjardins & Proctor, 2007). Jsou cytotoxické ve většině buněk eukaryot - způsobují inhibici syntézy proteinů. Mají lipofilní povahu, která způsobuje rychlé vstřebávání do krevního oběhu. Působí hematotoxicky – narušují krvetvorbu a poškozují lymfatické tkáně. Při styku s pokožkou mohou vznikat zarudlá, podrážděná místa až puchýřky. Při kontaktu toxinu s okem vznikají záněty spojivek a může dojít až k nevratnému poškození rohovky. Po vniku trichotecenů do krevního oběhu se projevuje nauzea, slabost, ztráta koordinace, do 3 hodin vodnatý průjem, později krvavý průjem, do 12-ti hodin může dojít k dušnosti, kašli, krvácení z nosu a bolestem břicha. U těžce otrávených jedinců může nastat smrt do několika hodin až dnů. Pro tyto vlastnosti byl jed využit jako biologická zbraň (Wannemacher et al., 1997).

Fumonisin

Jsou karcinogenní, u lidí způsobují karcinom jícnu a u lidského plodu různé vady. Fumonisin mají negativní účinek na mozek, plíce, játra, ledviny, slinivku břišní, varlata a krvetvorbu. U koní toxin způsobuje leukoencefalomalacii a u prasat pulmonální edém. Koně, u kterých se nemoc již projevila, uhynou (Vinicelli & Parker, 1995).

Zearalenony

Nejsou akutně toxické a nejsou spojovány se smrtelnými mykotoxózami u lidí či zvířat. Zearalenony jsou nesteroidní estrogení toxiny. Způsobují estrogení syndromy u prasat například vulvovaginitidy, narušují cyklus pohlavních hormonů, způsobují poruchy plodnosti (Vinicelli & Parker, 1995). Již z názvu je patrné, že se tyto toxiny vyskytují nejčastěji v kukuřici (*Zea mays*).

Fusariny

Fusarin C je mutagenní látka, ale nebylo prokázáno, že by způsobovala rakovinové bujení (Desjardins & Proctor, 2007).

2.2.5 Suchá hniloba bramborových hlíz

Suchou „fusariovou“ hnilobu brambor způsobují druhy *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. sulphureum* a jiné. Jde o nejčastější skládkovou chorobu brambor.

Hniloba vniká do hlíz jejich mechanickým poškozením (poškozením slupky nebo natlučením). Vyšší výskyt bývá při teplém a suchém konci vegetace (Jůzl et al., 2000).

Za 5 – 7 týdnů po sklizni se na hlízách začínají objevovat nekrotické skvrny, které postupně zvětšují svoji velikost. Obvykle jsou koncentricky zvrásněné, pokryté polštářky bílého, žlutého až růžového mycelia patogenu. Na řezu hlíz má hniloba vrstevnicový charakter, mohou se vyskytovat i menší dutiny. Obvyklé jsou směsné infekce s dalšími patogeny (houby a bakterie) (Jůzl et al., 2000).

Ochranou před chorobou je zdravá sadba, pěstování odolnějších odrůd, snížení mechanického poškození (odkamenění a vhodná technologie sklizně), termín sklizně, moření hlíz (thiabendazol a imazalil), správné skladovací podmínky (Jůzl et al., 2000). Termín sklizně je důležitý z hlediska vyzrálост hlíz, tedy i pevnosti slupky a celkové odolnosti proti mechanickému poškození.

2.2.6 *Fusarium solani*

Druh je celosvětově rozšířený v půdě, v rostlinách i živočiších. Patogen rostlin, ale i člověka, u kterého může způsobovat keratitidu. Je to producent fusarové kyseliny. Významný kontaminant skladovaných potravin, způsobuje skladové hniloby (suchá hniloba bramborových hlíz).

Makroskopické znaky

Kultivace na PDA půdě. Kolonie jsou velmi rychle rostoucí, 4,5 cm na 4 dny. Mycelium je vzdušné bílé až šedobílé. Spodní strana je často zelenavá, modrozelená či hnědá (Luginbuhl, 2010).

Mikroskopické znaky

Mikrokonidie se hojně tvoří na dlouhých vláknitých monofialidách, jsou protáhlé se zaoblenými konci, o velikosti 8–6 x 2–4 μm. Makrokonidie se tvoří na bohatě větvených konidioforech, větvenovité, mírně zakřivené, se 3-5 septy, cca 27-52 x 4,4-6,8 μm, se zaoblenou koncovou buňkou a nevýrazně pedicelátní bazální buňkou. Makrokonidie ze vzdušného mycelia jsou menší. Chlamydospory se tvoří interkalárně nebo v řetězcích (Luginbuhl, 2010).

Patogenita

Fusarium solani zahrnuje různorodé a široké spektrum hostitelů jako jsou například *Cucurbata spp.*, luštěniny (hniloba kořenu a stonku hrachu, syndrom náhlého úmrtí

sóji), *Solanum tuberosum* (suchá hniloba hlíz). Některé kmeny mohou způsobovat infekci i u lidí (Luginbuhl, 2010).

2.2.7 *Fusarium oxysporum*

Je celosvětově rozšířená houba. Některé podruhy jsou saprofyty a jiné ryze parazitické, které jsou původci některých rostlinných chorob.

Makroskopické znaky

Makroskopická morfologie se může výrazně lišit v různých médiích. Na PDA půdě má rychlý růst. Kolonie jsou zpočátku bílé, ale ve stáří se zbarvují lososově až purpurově (Sutton et al., 1998).

Mikroskopické znaky

Hyfy jsou přepaženy a hyalinní. Konidiofory jsou krátké a jednoduché. Makrokonidie jsou hojné, srpovité a tenkostěnné buňky. Jsou tři až pět přepažených měřicích 23-54 x 3-4,5 µm. Mikrokonidie jsou většinou nepřepažené, elipsoidní až válcovité, nepatrně zakřivené nebo rovné, 5-12 x 2,3-3,5 µm velké vyskytující se na krátkých monofialidách. Chlamydostry jsou přítomné a často hojné, vyskytující se jednotlivě a ve dvojicích (Sutton et al., 1998).

Patogenita

Fusarium oxysporum postihuje širokou škálu hostitelů v jakémkoliv věku. Rajče, tabák, luštěniny, tykvovitě, brambory a banány jsou jen některé z náchylných rostlin, ale mohou se také nakazit ostatní rostliny. Nákaza *Fusarium oxysporum* má symptomy, jako je vadnutí, chlorózy a nekrózy a zhnědnutí cévního systému (Moretti, 2009).

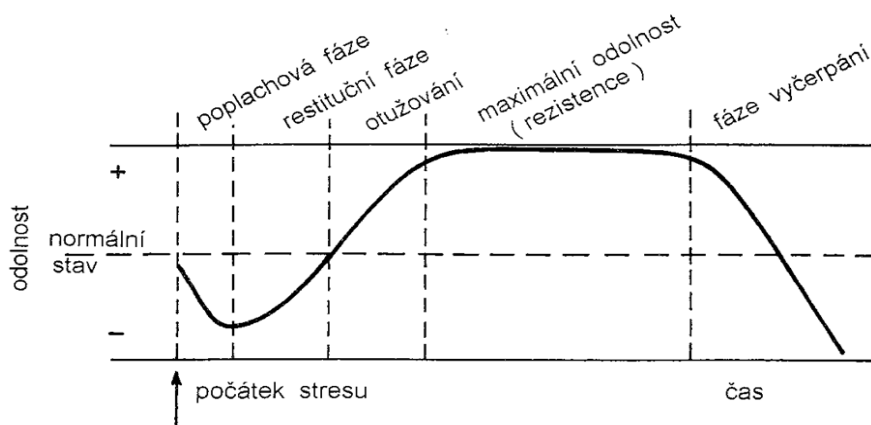
2.3 Obranné mechanismy rostlin vůči houbám

Rostliny jsou neustále vystaveny vlivům okolního prostředí a útokům patogenních organismů (tj. stresu). Přežití za těchto podmínek vyžaduje rychlé obranné reakce, které omezují šíření patogenů po počáteční infekci, a tím dojde k omezení onemocnění (Portieles et al., 2006). Obranné mechanismy rostlin se liší podle druhu. Tato práce se bude zabývat hlavně aktivní chemickou obranou, tedy syntézou obraných látek, které potlačují růst či přímo usmrcují patogenní houby. Dalšími způsoby obrany může být pasivní chemická obrana (přirozeně se vyskytující látky, které brání v růstu patogenu) a mechanická obrana (různé bariéry bránící v průniku patogenu do hostitele).

2.3.1 Stres

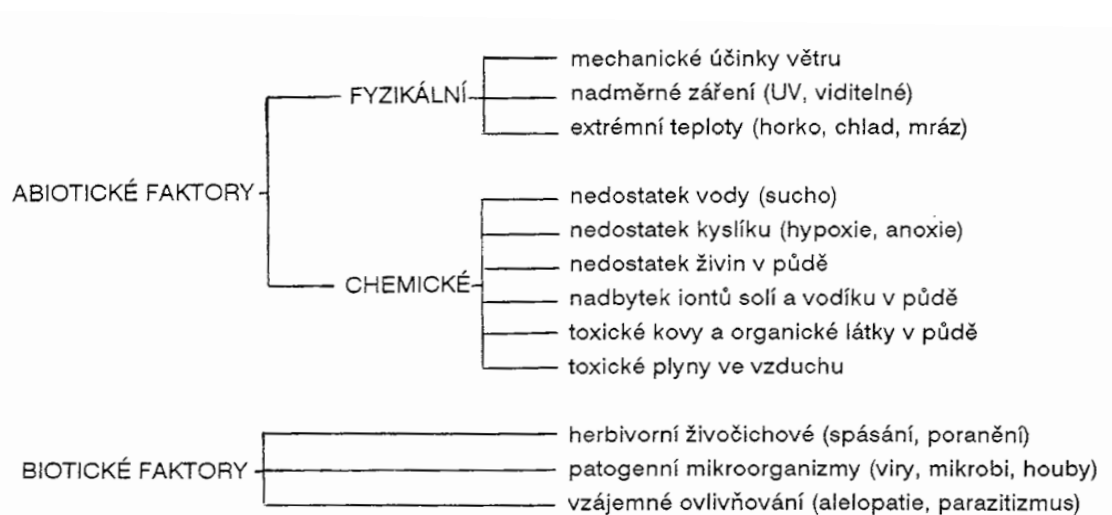
Biologický stres je faktor vnějšího prostředí, který indukuje potenciálně škodlivý účinek v živém organismu. Stres může působit na rostliny až letálně, ovšem je nezbytným stimulem pro vývoj rostlin, jak ontogenetický (klíčení rostlin za nízkých teplot), tak i evoluční.

Stres působí ve 4 fázích (viz obr. 2). Počátek stresu je nazýván reakční fází (iniciační), kdy se spouští signalizační kaskáda, klesá vitalita rostliny a katabolické procesy začínají převládat nad anabolickými procesy. Po té následuje restituční fáze neboli fáze odolnosti, při které se spouští adaptační a reparační procesy. Při delším působení stresu může nastat fáze vyčerpání, tedy konečná fáze, kdy je intenzita stresu tak vysoká, že dochází k nevratnému poškození organismu, které je letální. Přestane – li stres na rostlinu působit, nastává fáze regenerační, při které dochází k částečné či celkové reparaci organismu.



Obr. 2: Idealizovaný průběh stresové reakce (Procházka et al., 1998)

Předem je však potřeba zdůraznit, že průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti. Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru (obr. 3) a nazývané jako aklimatizace může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře) (Procházka et al., 1998).



Obr. 3: Přehled nejdůležitějších stresorů (Procházka et al., 1998)

2.3.2 Rozdělení obranných mechanismů

Odpovědi obranného mechanismu na stres může být dvojího typu: pasivní (konstitutivní) nebo aktivní (rostlina na stres reaguje změnou metabolismu).

Pasivní obrana

Tvoří ji určité konstrukční prvky rostlin nebo typické metabolity, které se v rostlině běžně vyskytují (není to reakce na stres). Vnější vrstvy rostlinného povrchu mohou tvořit speciální odolné látky jako je vosk, který nemůže být napaden nebo stráven plísněmi. Přítomnost silných materiálů jako je lignin, kůra, pokožka mohou zabraňovat vniknutí patogenu do rostliny.

Také sekundární metabolity jako jsou alkaloidy, třísloviny, fenoly, pryskyřice a jiné, které působí toxicky na patogeny, brání vniku do rostliny a jejich přežití v hostiteli. Tyto látky mají insekticidní, antimikrobiální, antimykotické a antibakteriální účinky. Mimo sekundární metabolity mohou mít tyto vlastnosti i určité proteiny, například inhibitory proteas působí antimikrobiálně.

Aktivní obrana

Obranná odpověď není před napadením organismu k dispozici. Buněčná stěna je prvním místem obranné linie. Když patogen napadne rostlinu, tak infikované buňky spustí signalizační kaskádu, která ostatním buňkám organismu ohlásí napadení. Tehdy začne v buňce obranná reakce. Zhustí se nebo ztloustne (doplnění o nový materiál) buněčná stěna, aby byla znemožněna penetrace patogenu do buňky, tato reakce se odehrává jen v blízkosti napadeného místa.

Další možnou odpovědí je hypersenzitivní reakce v oblasti napadení, buňky se stávají nekrotické. Nebo se může změnit jejich metabolismus, zpomalí se dýchání a začnou se hromadit toxické látky. Tyto buňky nejsou pro patogen vhodné a to zpomaluje celkový postup infekce.

V okolí napadené tkáně některé druhy rostlin produkují specifické chemické látky, které patogen potlačují. Například fytoalexiny, jsou to nízkomolekulární látky, které se začínou syntetizovat po napadení rostliny. Fytoalexiny jsou velmi toxické pro houby i bakterie (Procházka et al., 1998).

2.3.3 Interakce s patogenními organismy (houby)

Vztah mezi patogenem a hostitelem se neustále vyvíjí, v průběhu koevoluce se vyvinuly systémy, pomocí kterých může patogen účinněji napadnout a vniknout do hostitele, a zároveň rostliny získaly schopnost se účinněji bránit infekčním agens (Heřmanová et al., 2006).

Jejich průnik do buněk je sice ztížen buněčnou stěnou, avšak ani ta není pro řadu z nich nepřekonatelnou překážkou. Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů (Procházka et al., 1998). Mezi tyto enzymy patří například kutinasy, které jsou schopné degradovat kutin (jednu z hlavních složek rostlinné pokožky) a tak mohou patogeny snáze pronikat do hostitele. Peptidasy také usnadňují vnik do buňky hostitele, tak že degradují pektinové komponenty buněčné stěny rostlin. Celulasy, hemicelulasy a ligninasy se také podílí na degradaci buněčných stěn (Castro & Fontes, 2005). Mechanické poranění usnadňuje průnik patogenů do hostitele. Proto rostlina okamžitě reaguje na poranění syntézou některých antimikrobiálních a antifungálních látek (pryskyřice).

Nejen průnik, ale často i kontakt patogenního organismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat jeho působení a šíření do ostatních buněk. Jen málo z těchto procesů má

zcela obecný charakter, spíše lze pozorovat velkou rozmanitost u jednotlivých skupin rostlinných druhů i u jednotlivých orgánů (Procházka et al., 1998).

Ke spuštění obranné reakce je třeba podmět (elicitor), který bývá uvolněný buď samotným patogenem, nebo napadenou buňkou. Elicitor je třeba k aktivaci genů odpovědných za obrannou reakci (Procházka et al., 1998). Často to bývá specifický metabolit, například sloučeniny, které se uvolňují při narušení buněčné stěny.

Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických stresových proteinů, jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Patří k nim nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako fytoncidy či inhibitory (Procházka et al., 1998).

Velmi rychlou obrannou reakcí je tvorba superperoxidu. Při napadení rostliny patogeny se též rychle zvyšuje tvorba etylenu, který se podílí na iniciaci genové exprese (Procházka et al., 1998).

Další formou obrany je hypersenzitivní reakce. V napadené buňce i v okolních buňkách se spouští řízená nekróza, při které dochází v důsledku zvýšené koncentrace volných radikálů, peroxidu vodíku a dalších toxických látek k usmrcení buňky i buněk v jejím blízkém okolí. Hypersenzitivní reakce je pro okolní buňky často spouštěcím mechanismem pro syntézu fytoncidů a stresových hormonů PR neboli proteinů souvisejících s patogenezí. Proteiny PR jsou definovány jako stresové proteiny, jejichž syntéza je indukována přítomností specifického infekčního organismu. V současnosti jsou klasifikovány do 11-ti skupin (Heřmanová et al., 2006).

Jiným typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu kalózy, který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám (Procházka et al., 1998).

U několika fytopatogenních hub je známo, že produkují extracelulární proteinázy, a poslední výsledky naznačují, že hrají proteinázy aktivní roli v rozvoji onemocnění. Rostliny syntetizují inhibitory polypeptidů, které mohou potlačovat aktivitu enzymu v reakci na útok proteinázy, kterou vyprodukoval fytopatogenní mikroorganismus. Tento jev byl poprvé zaznamenán v rajčatech nakažených *Phytophthora infestans*, ve kterém bylo zjištěno, že zvýšené množství inhibitorů trypsinu a chemotrypsinu koreluje s obrannou reakcí rostliny vůči patogenu (Kim et al., 2005).

2.3.4 Nепroteinové antifungální látky

Jsou to látky, které potlačují růst hub nebo je přímo usmrcují. Obvykle se vyskytují v rostlinách až při působení stresoru, tedy houby. Jsou velmi rozmanité funkcí i molekulovou hmotností.

Mechanismus účinku většiny antifungálních látek spočívá ve zvýšení permeability buněčné stěny hub. Důsledkem je únik elektrolytů a makromolekul z buňky do vnějšího prostředí vedoucí k jejímu usmrcení (Hampl et al., 2007).

Antifungální aktivitu prokazují některé proteiny, aromatické sloučeniny a jejich deriváty, nenasycené mastné karboxylové kyseliny (Hampl et al., 2007).

Karboxylové kyseliny a jejich deriváty

Nenasycené mastné kyseliny C-7 až C-11 se používají lokálně při řadě dermatomykóz. Nejznámější z nich je kyselina undecylenová. Obvykle se aplikuje jako směs volné kyseliny a její zinečnaté soli. Z aromatických kyselin se používá především kyselina salicylová a její deriváty (Hampl et al., 2007).

Syntetické antifungální azoly vykazují široké spektrum aktivity, zahrnující téměř všechny druhy hub. Mechanismus účinku těchto látek spočívá v inhibici syntézy fúgálních lipidů. Patří sem například klotrimazol a ketokonazol (Hampl et al., 2007).

2.3.5 Antifungální proteiny

Antifungální proteiny jsou specifické stresové obranné proteiny, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. U vyšších organismů jsou tyto proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného mechanismu (Heřmanová et al., 2006).

Antifungální proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s dříve popsanou skupinou proteinů, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností nebo mechanismu účinku. Většina autorů se shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám proteinů PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita (tab. 2). Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách. K základním pěti skupinám rostlinných antifungálních proteinů jsou dnes řazeny další skupiny – defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklofilinu, proteiny inaktivující ribozomy, proteiny přenosu lipidů a inhibitory proteas (Heřmanová et al., 2006).

Do skupiny PR proteinů mohou být zařazeny jen proteiny, jejichž syntéza je indukována přítomností patogenu (Ederva, 2005; Selitrennikoff, 2001; Heřmanová et al., 2006).

Tab.2: Přehled antifungálních proteinů podle (Seletrennikoff, 2001; Heřmanová et al., 2006; Portieles et al., 2006; Castro a Fontes, 2005)

Antifungální proteiny	Vlastnosti	Výskyt	Antifungální aktivita vůči druhům
Proteiny PR-1	Podobnost proteinům bohatých na cystein	Rýže, kukuřice, tabák, ječmen aj.	<i>Uromyces fabae</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Phytophthora parasitk</i> , <i>Perenospora tabaci</i> aj.
Proteiny PR-2	-1,3-endoglukanasová aktivita	Hrách, tabák, brambor, obilí a zelenina	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> aj.
Proteiny PR-3	Edochitinasová aktivita	Tabák, okurky, hrách, obilí aj.	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>A. radicina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> , <i>Coprinus comatus</i> aj.
Proteiny PR-4	Mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny	Brambor, tabák, ječmen, rajčata aj.	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> aj.
Proteiny PR-5	Podobnost primární struktury s thaumatinem	Kukuřice, sója, rýže, pšenice, tabák, rajčata, dýně, fazole, ječmen, len aj.	Velmi široké spektrum houbových patogenů
Defensiny	Na cystein bohaté proteiny, obsahují 4 disulfidické můstky	Pšenice, ředkvička, brambory, okrasné rostliny (jiřina) aj.	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Candida albicans</i> aj.
Thioniny	Na síru bohaté proteiny	Pšenice aj.	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> a <i>Drechslera teres</i>
Proteiny podobné cyklofilinu	Podobnost cyklofilinům	Fazole aj.	<i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>B. cinerea</i> a <i>Coprinus comatus</i>
Proteiny inaktivující ribozomy	N-glykosidasy, které odbourávají purin z rRNA	<i>Mirabilis expansa</i> , hrách skočec, jmelí, <i>Momordica charantia</i>	Široké spektrum houbových patogenů
Proteiny přenosu	Schopnost přenášet	Živočichové, houby a rostliny	Široké spektrum houbových patogenů

lipidů	fosfolipidy mezi membrány		
Killer proteins	Schopnost vázat se na specifické receptory na povrchu buněk hub	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Ustilago maydis</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> , několik <i>Pichia</i>	Široké spektrum houbových patogenů
Inhibitory proteas	Schopnost inhibovat proteiny	Brambor, obiloviny, kukuřice aj.	<i>Claviceps</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>

V následujících kapitolách budou podrobněji vypsány antifungální proteiny, které byly izolovány z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

2.3.6 Proteiny PR-2

Vzhledem k enzymové aktivitě PR-2, spočívá jejich mechanismus účinku v hydrolyze struktury β -1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupné oslabování buněčných stěn vede následně k lyzi buněk. V primární struktuře β -glukanas je vždy přítomná oblast dvou reziduí kyseliny glutamové. Tato oblast je považována za aktivní místo, umožňující navázání na strukturu β -glukanu a štěpení β -glykosidických vazeb (Heřmanová et al., 2006).

Proteiny PR-2 se dělí do tří tříd na základě analýzy aminokyselinové sekvence. Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 33 až 36 kDa (Seliternnikoff, 2001).

U rostlin bramboru (*Solanum tuberosum*) byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita u zásobního proteinu hlíz, patatinu. Následně byla dokázána antifungální aktivita tohoto proteinu vůči patogenu *Phytophthora infestans* (Heřmanová et al., 2006).

2.3.7 Proteiny PR-4

Molekulová hmotnost je od 3,1 do 20 kDa, pro kyselé proteiny se hmotnost pohybuje v rozmezí 13 – 14,5 kDa. Proteiny PR-4 vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a degradaci proteasami (Heřmanová et al., 2006). Proteiny PR-4 jsou rozděleny do dvou skupin. Proteiny třídy I mají N-terminální doménu vázající se na chitin, která je podobná doméně heveinu. Patří do nadtřídy lektinů vázajících se na chitin. Proteiny třídy II tuhle doménu nemají (Selitrennikoff, 2001).

Mechanismus účinku proteinů PR-4 není zcela objasněn. Proteiny PR-4 třídy I mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny, a tím narušovat polaritu a růst buněk. Mechanismus účinku proteinů PR-4 třídy II, které postrádají vazebnou doménu, je nejasný (Heřmanová et al., 2006).

2.3.8 Defensiny

Defensiny jsou různorodá skupina o nízké molekulové hmotnosti a na cystein bohatých proteinů. Molekulová hmotnost defensinů je 5 kDa (Selitrennikoff, 2001). U rostlin mají defensiny od 45 do 54 aminokyselin a obsahují čtyři disulfidické můstky (Portieles et al., 2006). To těmto proteinům poskytuje stabilní strukturu (Heřmanová et al., 2006).

Mechanismus účinku defensinů není zcela znám. Při ošetření houby *N. crassa* defensiny Rs-AFP2 (*Raphanus sativus*) a DM-AMP1 (*Dahlia merckii*) byla zjištěna schopnost vazby na specifické membránové receptory, následkem čehož docházelo k ztrátě iontů K^+ a lyzi buněk (Heřmanová et al., 2006). Účinek může být snížen přítomností Ca_2^+ (Portieles et al., 2006).

2.3.9 Inhibitory proteas

Inhibitory proteas patří k nejčastěji se vyskytujícím antifungálním proteinům rostlin (Heřmanová et al., 2006). Cysteinové inhibitory proteas byly izolovány z velkého počtu rostlin a vytvářejí čtvrtou skupinu cystatinů, tzv. fytocystatiny (Selitrennikoff, 2001). Fytocystatiny jsou jednoduché polypeptidy o velikosti 10 a 12 kDa, které vykazují antifungální aktivitu vůči řadě zástupců fytopatogenních hub (Heřmanová et al., 2006).

Inhibitory typu Kunitz vykazují antifungální aktivitu, například proti druhu *Fusarium culmorum* (Bárta a Bártová, 2007; Sprenskaya et al., 2006). Lze je izolovat z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum*), které je produkují při působení stresoru. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 18 až 22 kDa, mají disulfidické místo (Habib a Fazili, 2007).

Princip antifungální aktivity inhibitorů proteas není znám. Z hlediska ochrany rostlin je významná i schopnost těchto proteinů inhibovat trávicí enzymy hmyzích škůdců a to především trypsin, chymotrypsin a α -amylasu. U inhibitorů proteas byla popsána bifunkčnost - inhibice trávicích enzymů i antifungální aktivita. Nejpodrobněji byla antifungální aktivita bifunkčních proteinů popsána u proteinu zeamatinu (*Z.mays*). Inhibitory proteas, izolované např. z ječmene nebo pšenice, nebyly z hlediska antifungální aktivity studovány (Heřmanová et al., 2006).

Potide-G je malý (5,5 kDa) antifungální peptid, který je izolován z hlíz brambor (*Solanum tuberosum*). Tento peptid je tepelně stabilní a téměř úplně potlačuje proteolytickou aktivitu trypsinu, chymotrypsinu a papainu, bez hemolytické aktivity. Kromě toho, potide-G silně potlačuje růst různých bakterií a hub (*Candida albicans* a *Rhizoctonia solani*). Podle N-terminální sekvence (zbytky 1 až 11) bylo zjištěno, že protein patří mezi inhibitory proteas Kunitz rodiny (Kim et al., 2009).

Potamin-1 (PT-1) trypsin, chymotrypsin inhibitory proteas lze izolovat z hlízy bramboru (*Solanum tuberosum*). Potamin-1 (PT-1) je termostabilní peptid s antifungální aktivitou a skládá se z polypeptidových řetězců spojených disulfidickými můstky. PT-1 potlačuje růst hub jako je *Candida albicans* a *Rhizoctonia solani*. N-terminální sekvence je z 62% homologická k serinovým proteasovým inhibitorům, které patří do rodiny Kunitz (Kim et al., 2009).

2.3.10 Ostatní antifungální proteiny

Existuje celá řada rostlinných antifungálních proteinů, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin. Snakin-1 byl izolován z brambor (*Solanum tuberosum* L.), má velikost 6,9 kDa a je účinný již při koncentraci 10 μ M. Antifungální účinky vykazuje i 30 kDa velký glykoprotein izolovaný z rostliny *Engelmannia pinnatifida*. Ani u jednoho z těchto proteinů není znám mechanismus účinku (Heřmanová et al., 2006).

Z hlízy brambor (*Solanum tuberosum* L.) byl například izolován pseudothionin (PTH-St1) o molekulové hmotnosti 5 kDa. U kterého byla zjištěna aktivita proti bakteriím a houbám jako je *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, *Pseudomonas solanacearum* a *Fusarium solani*. PTH-St1 neinhibuje trypsin a hmyzí α -amylázy, a v rozporu s pravými thioniny, nemá vliv na syntézu proteinů buňky a β -glukuronidasou činnost (Kim et al., 2009).

3 Cíle práce

- Izolace proteinu z hlízy bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a následná úprava proteinu tepelnou izolací.
- Identifikace peptidových frakcí pomocí SDS-PAGE.
- Testy antifungálních účinků vůči rodu *Fusarium*.
- Statistické vyhodnocení výsledků.

4 Materiál a metody

4.1 Hlízy bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Jako materiál pro izolaci proteinu byly použity hlízy odrůdy Marabel bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). Marabel je raná konzumní odrůda, která má oválné hlízy s tmavě žlutou dužninou. Hlízy byly vypěstovány na pokusném pozemku Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2011. Do doby průběhu zpracování byly hlízy skladovány v chladnu (4°C) a temnu při 95% relativní vlhkosti vzduchu.

4.2 Houby

Testy probíhaly na patogenních houbách rodu *Fusarium*, dvou kmenech druhu *Fusarium oxysporum* a třech kmenech druhu *Fusarium solani*. V tab. 3 jsou uvedeny kmeny hub použitých v práci.

Tab. 3: Kmeny z České sbírky mikroorganismů použité v práci

Kmen	Označení kmene v České sbírce mikroorganismů	Označení hub v experimentu
<i>Fusarium solani</i>	8079	C
<i>Fusarium solani</i>	8014	D
<i>Fusarium solani</i>	1036	E
<i>Fusarium oxysporum</i>	F-65	J
<i>Fusarium oxysporum</i>	17	F

4.3 Příprava kultivačního média

ISA je částečně definované médium určené pro testy antimikrobiální citlivosti. V tab. 4 je uvedeno složení média Iso-Sensitest Agar typu CM0471 (Oxoid, Velká Británie).

Tab. 4: Složení média ISA CM0471 (Oxoid, Velká Británie)

Typická Formule	g / l
Hydrolyzovaný kasein	11,0
Peptony	3,0
Glukóza	2,0
Chlorid sodný	3,0
Rozpustný škrob	1,0
Hydrogenfosforečnan sodný	2,0
Octan sodný	1,0

Hořčík glycerofosfát	0,2
Glukonát vápenatý	0,1
Síran kobaltnatý	0,001
Síran měďnatý	0,001
Síran zinečnatý	0,001
Síran železnatý	0,001
Chlorid manganatý	0,002
Menadione	0,001
Kyanokobalamin	0,001
L-cystein hydrochlorid	0,02
L-tryptofan	0,02
Pyridoxin	0,003
Pantothenát	0,003
Nikotinamid	0,003
Biotin	0,0003
Thiamin	0,00004
Adenin	0,01
Guanin	0,01
Xantin	0,01
Uracil	0,01
Agar	8,0
Celkem	31,4

ISA se připraví přidáním 31,4 g směsi do 1 l destilované vody a přivede se k varu (rozpuštění agaru). Sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa po dobu 15 minut. Připravený agar se pipetou přenese po 8 ml do Petriho misek, nechá se ztuhnout. Skladujeme do použití v chladu (2-8°C) a temnu.

4.4 Příprava proteinu

Hlízy bramboru se omyjí pod tekoucí vodou, nakrájí se drobné kostky a odšťavní se pomocí domácího odšťavňovače (AEG). U získané bramborové šťávy (PFJ – potato fruit juice) se provede centrifugace při 4500 ot./min po dobu 10 minut při teplotě 4°C (Rotina 420R Hettich Zentrifugen, Germany). Supernatant se převede do kádinky a filtruje se na běžném papírovém filtru K1 (ThermoFisher, CZ), to vede k odstranění drobných částic. U přefiltrované hlízové šťávy se provede úprava reakce na pH 5 pomocí 0,5 M H₂SO₄.

Poté se u poloviny objemu PFJ provede odstranění majoritních proteinových komponent prostřednictvím tepelné koagulace, zahřáním objemu v kádince (cca 500 ml PFJ) ve vodní lázni na teplotu 80°C (reálná teplota PFJ) po dobu 10 minut. Provede se následná centrifugace při 4500 ot./min po dobu 10 minut při teplotě 4°C (centrifuga Rottina 420R, Hettich Zentrifugen, Germany). Supernatant se převede do plastových dóz (objem 900ml), které dáme zamrazit do mrazničky na -20°C. Druhá polovina PFJ se zamrazí na teplotu -20°C (bez tepelné koagulace).

Roztok se zakoncentruje pomocí lyofilizace při teplotě -50°C, tlaku 420 mbar, cca na 48 hodin do konstantní hmotnosti na lyofilizátoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Německo).

Lyofilizovaný protein se převede na 30% roztok přidáním deionizované vody (na 29,95 g proteinu se přidá 99,83 ml deionizované vody). Roztok převedeme do dialyzačního potrubí, vložíme do kádinky s vychlazenou deionizovanou vodou o objemu 1800 ml. Dialýza probíhá po dobu 24 hodin, kdy se v průběhu dialýzy mění deionizovaná voda (4x po přibližně stejných časových úsecích). Následně takto upravený roztok se převede do dóz a opět se zakoncentruje pomocí lyofilizátoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Německo) při stejných podmínkách. Získaná sušina se skladuje až do použití v důkladně uzavřených dózách v suchu při teplotě -20°C.

4.5 SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí amonického detergentu dodecylsírany sodného. Pro SDS-PAGE byl použit gel pro analýzu peptidů.

Gel se skládá ze tří částí: separační gel (Tab. 5), spacer gel (Tab. 6), zaostřovací gel (Tab. 7). Všechny složky byly dobře promíchány a postupně nalévány mezi skla umístěné v nalévacím rámečku, nejprve separační gel (převrství se dH₂O a po 30 minutách se slije), spacer gel (15 mm od zaostřovacího gelu) a nakonec zaostřovací gel (8 mm od spodku hřebínku), který byl převrstven 1 ml vodou syceného izobutanolu. Vloží se hřebínek a nechá se polymerizovat při pokojové teplotě 60 minut. Po té se hřebínek vyjme.

Tab. 5: Složení separačního gelu

13,4 ml	dH ₂ O
20 ml	Gelový pufr (3 M Trisma base, 0,3 % SDS, úprava na pH 8,9 HCl)
20 ml	Akrylamid: 1 X crosslinker (AC/bis=48/1,5 g)
6,4 ml	Glycerol
20 µl	TEMED
200 µl	10 % persíran amonný
60 ml	Celkový objem

Tab. 6: Složení spacer gelu

13,8 ml	dH ₂ O
10 ml	Gelový pufr (3 M Trisma base, 0,3 % SDS, úprava na pH 8,9 HCl)
6 ml	Akrylamid: 1 X crosslinker (AC/bis=48/1,5 g)
10 µl	TEMED
100 µl	10 % persíran amonný
30 ml	Celkový objem

Tab. 7: Složení zaostřovacího gelu

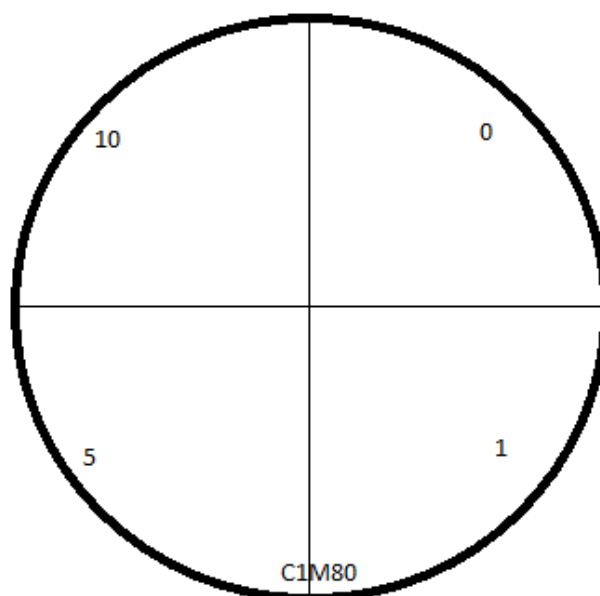
20,6 ml	dH ₂ O
3,8 ml	Zaostřovací gelový pufr (1M TRIS-HCl, pH 6,8)
5 ml	Zaostřovací akrylamid (AC/bis=30/0,8 g)
300 µl	EDTA (10 %)
15 µl	TEMED
300 µl	10 % persíran amonný
30 ml	Celkový objem

Připravený gel se vloží do vany, kde je připravený horní vanový pufr-katodový (1 M Tris, 1M Tricine, 1 % SDS) a dolní vanový pufr-anodový (2 M Tris, upravit pH na 8,9 pomocí HCl). Do jamek se nanese 10µl připraveného vzorku - vzorek smíchaný s vodou a nanášecím puffrem (2 ml 10 % SDS v dH₂O, 1 ml glycerol, 0,625 ml 1 M tris-HCl pH 6,8, 6 ml dH₂O, BPB, před nanesením BME (5 %) a 3 min vařit). Separace probíhá při 200 V asi 4 hodiny v chladu.

Po separaci se gel vyjme a opláchne destilovanou vodou, po té se gel vloží do misky s fixačním roztokem (25 % isopropanol, 7 % kyselina octová + zbytek do 100 % dH₂O) a dá se na třepačku na 16 hodin. Separované proteiny byly detekovány pomocí Coomassie Brilliant Blue (1 % ve fixačním roztoku) po dobu 30 minut. Gel se po té odbarvuje pomocí fixačního roztoku. Takto upravený gel se suší na skleněných destičkách zabalený v celofánu. Po usušení se gel převede do digitální formy a zpracuje se pomocí digitální obrazové analýzy.

4.6 Experiment

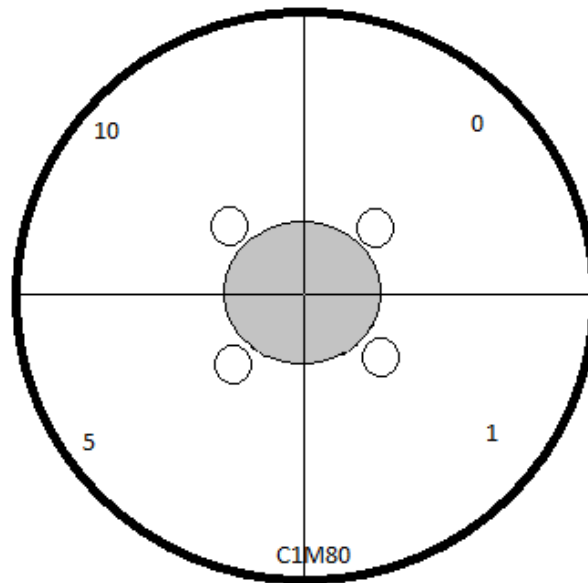
Očkování hub se provádí na médium ISA v Petriho miskách ve sterilním prostředí (flow box). Petriho miska se označí podle schématu na obr. 4. Sterilizovaným korkovrtem se vyřízne v agaru porostlém houbovou kulturou kruhová výseč, která se za pomoci sterilního skalpelu přenese na střed kříže označené Petriho misky s ISA. Naočkované Petriho misky se vloží do thermoboxu a kultivují se při teplotě 25°C 24 hodin.



Obr. 4: Schéma značení Petriho misky

Protein se aplikuje v ředění 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml a 0 mg/ml (deionizovaná voda). Na analytické váze AB54-S (Mettler Toledo) se naváží 100 mg proteinu do zkumavky a přidá se 10 ml deionizované vody, promíchá se. Centrifuguje se při teplotě 4°C po dobu 10 minut (tvorba homogenního roztoku) (Rotina 420R, Hettich zentrifugen, Germany). Roztok se převede přes mikrobiální filtr o velikosti síta 0,22 µm. Připraví se mikrozkušavky (ependorftube) pro ředění 10 mg/ml (převede se 900 ml roztoku proteinu), 5 mg/ml (převede se 450 ml roztoku proteinu a 450 ml deionizované vody), 1 mg/ml (převede se 90 ml roztoku proteinu a 810 ml deionizované vody), 0 mg/ml (převede se 900 ml deionizované vody) a do použití se uschovávají v chladnu a temnu. Toto ředění se provede pro protein upravený tepelnou koagulací i pro protein bez úpravy tepelnou koagulací. Zbytek roztoku se zamrazí na teplotu -20°C a uschová pro pozdější použití.

Po 24 hodinách kultivace naočkovaných Petriho misek houbou se ve sterilním prostředí (flow box) provede aplikace příslušných ředění do kruhových jamek. Kruhová výseč se udělá sterilním korkovrtem 1 mm od okraje houbové kultury a kruhovou výseč vyjmeme sterilním skalpelem (obr. 5). Do těchto vzniklých jamek se pipetou přenes 30 ml roztoku příslušného ředění. Petriho misky se přemístí do thermoboxu (opatrně, aby se nerozlil protein) a kultivují se 24 hodin při teplotě 25°C.



Obr. 5: Schéma aplikace proteinu

Po 24 a 48 hodinách kultivace se Petriho misky převedou do digitalizované formy pomocí fotoaparátu. Hodnocení plochy inhibice radiálního růstu se provádí pomocí programu AutoCAD 2010 (zkušební verze) na digitálních fotografiích. Toto hodnocení se zakládá na radiálním růstu hub, kdy je z této kružnice odečtena plocha inhibičních zón růstu.

5 Výsledky

5.1 SDS-PAGE

V tab. 8 jsou proteinové vzorky po separaci na SDS-PAGE. Protein bez tepelné koagulace obsahuje standardní zastoupení všech bramborových peptidových frakcí vyskytujících se v PFJ (patatin, majoritní peptidové frakce inhibitorů proteas). Protein, který byl upraven tepelnou koagulací, vykazuje změny v zastoupení peptidových frakcí. Termolabilní peptidové frakce (patatin) byly vysráženy. Termostabilní peptidové frakce jsou zastoupeny majoritními peptidovými frakcemi inhibitorů proteas. Na pracovišti bylo zjištěno, že peptidy obsažené v takto upraveném vzorku jsou hlavně serinové inhibitory proteas (Bárta, os. sdělení).

Tab. 8: SDS-PAGE gel (LB=nanášecí pufr, Marker SigmaTM, IP inhibitory proteas)

Hmotnostní Sigma TM	Marker	Protein bez tepelné koagulace (20 μ l vzorku +20 μ l vody+10 μ l LB)	Protein po tepelné koagulaci (15 μ l vzorku +25 μ l vody+10 μ l LB)
kDa			
26,6		Patatin	
17			
14,2		IP	IP
6,5			IP

5.2 Vyhodnocení plochy inhibice radiálního růstu

Hodnocení bylo provedeno na pěti kmenech rodu *Fusarium* v pěti opakováních focených po 24 hodinách růstu (od aplikace proteinu) a po 48 hodinách. Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica 9. V tab. 9 je výstup analýzy rozptylu - všechny sledované faktory vykázaly přímý vliv na inhibici růstu.

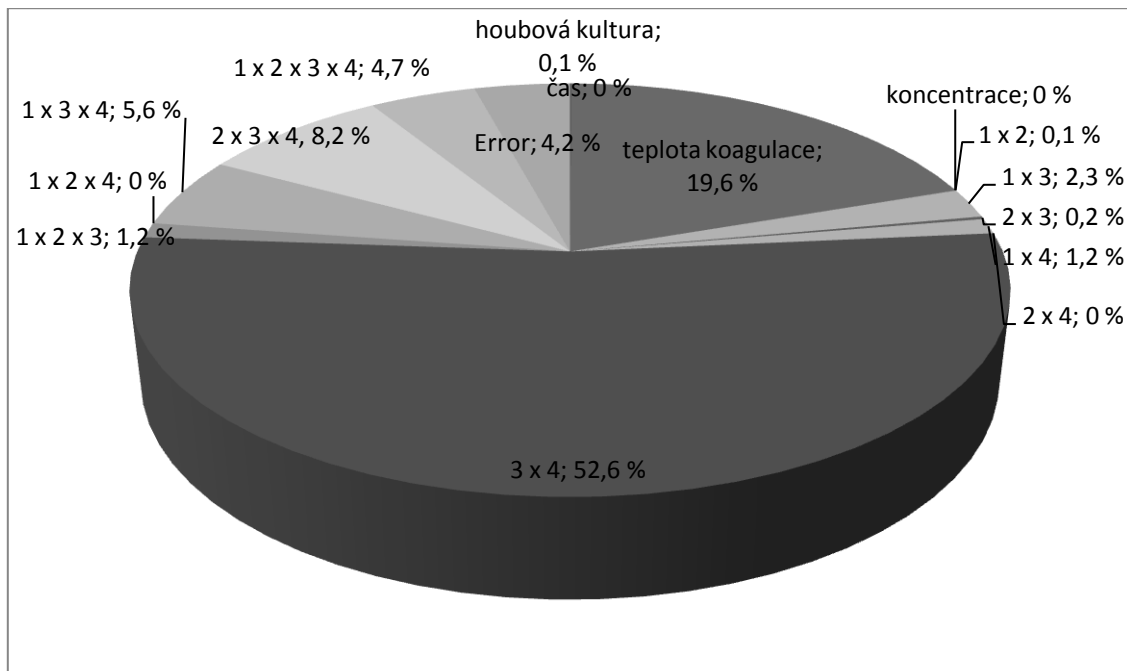
Tab. 9: Analýza rozptylu (ANOVA) vícefaktorová (Statistica 9). *SS* = součet čtverců (Sum of Squares), *Degr. of.* = stupeň volnosti (Degree of Freedom), *MS* = průměr čtverců (Mean Square), *F* = testové kritérium, *p* = *p*-hodnota, % = procentuální podíl faktorů působících na velikost plochy inhibice radiálního růstu.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	12,19988	1	12,19988	1753,536	0,000000
houbová kultura (1)	1,30697	4	0,32674	46,964	0,000000
čas (2)	0,68348	1	0,68348	98,239	0,000000
teplota koagulace (3)	12,19988	1	12,19988	1753,536	0,000000
koncentrace (4)	14,19760	3	4,73253	680,225	0,000000
1 x 2	0,37711	4	0,09428	13,551	0,000000
1 x 3	1,30697	4	0,32674	46,964	0,000000
2 x 3	0,68348	1	0,68348	98,239	0,000000
1 x 4	1,63772	12	0,13648	19,616	0,000000
2 x 4	1,14306	3	0,38102	54,766	0,000000
3 x 4	14,19760	3	4,73253	680,225	0,000000
1 X 2 x 3	0,37711	4	0,09428	13,551	0,000000
1 x 2 x 4	0,54364	12	0,04530	6,512	0,000000
1 x 3 x 4	1,63772	12	0,13648	19,616	0,000000
2 x 3 x 4	1,14306	3	0,38102	54,766	0,000000
1 x 2 x 3 x 4	0,54364	12	0,04530	6,512	0,000000
Error	2,20546	317	0,00696		

Na obr. 6 je zobrazen procentuální podíl jednotlivých faktorů a interakcí na celkové variabilitě hodnot plochy inhibice radiálního růstu. Největší vliv na velikost plochy inhibice radiálního růstu měla interakce mezi faktory teplota koagulace (díky rozdílnému spektru peptidových frakcí) a koncentrace vzorku (52,6 %).

Proteinové složení vzorku (dané teplotou koagulace) mělo velmi významný vliv na celý experiment (19,6 %). Vzorky, které nebyly upraveny tepelnou koagulací, neměly potenciál vytvářet inhibiční zóny při kontaktu s testovanými patogeny, protože obsahovaly nízkou koncentraci proteinů s antifungální aktivitou. V následující prezentaci výsledků – grafy a fotografie v příloze – nejsou zahrnuty efekty vzorů bez úpravy tepelnou koagulací.

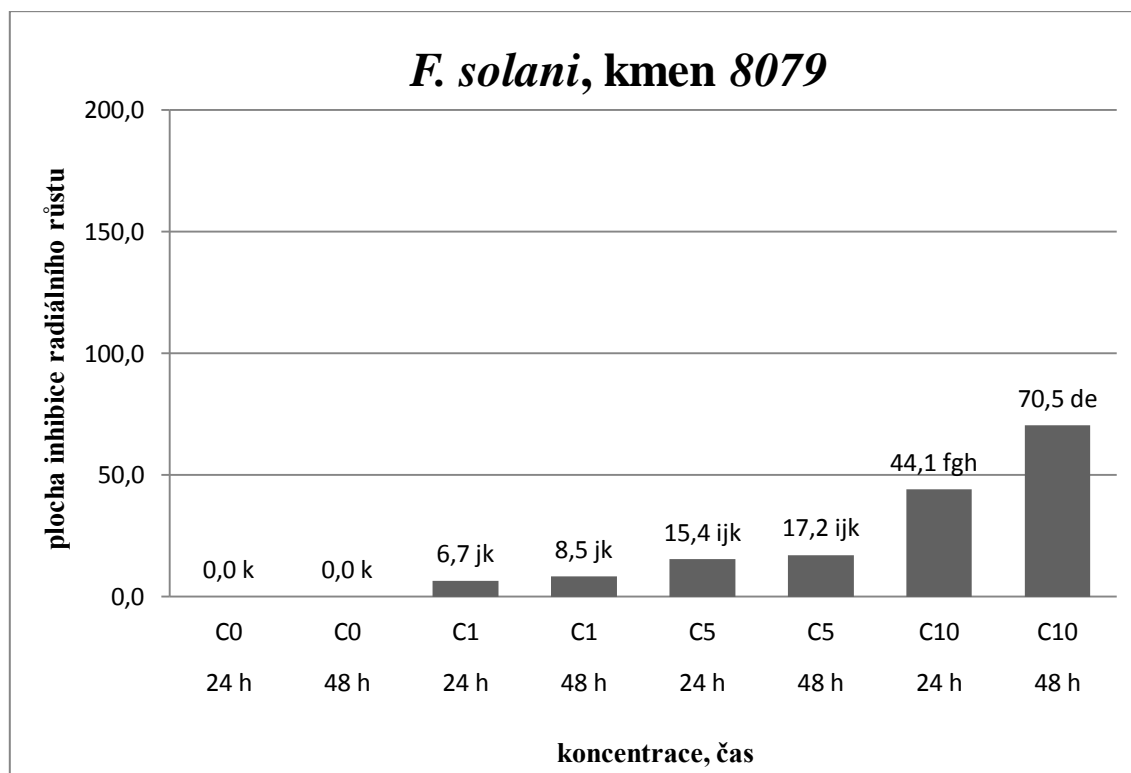
Další interakcemi majícími vliv na plochu inhibice radiálního růstu houbových kultur jsou čas x teplota koagulace x koncentrace (8,2 %), houbová kultura x teplota koagulace x koncentrace (5,6 %), houbová kultura x čas x teplota koagulace x koncentrace (4,7 %). Chyba zde zastupuje 4,2 %.



Obr. 6: Procentuální podíl faktorů interakcí na celkové variabilitě hodnot plochy inhibice radiálního růstu.

5.2.1 Vyhodnocení *Fusarium solani* kmen 8079

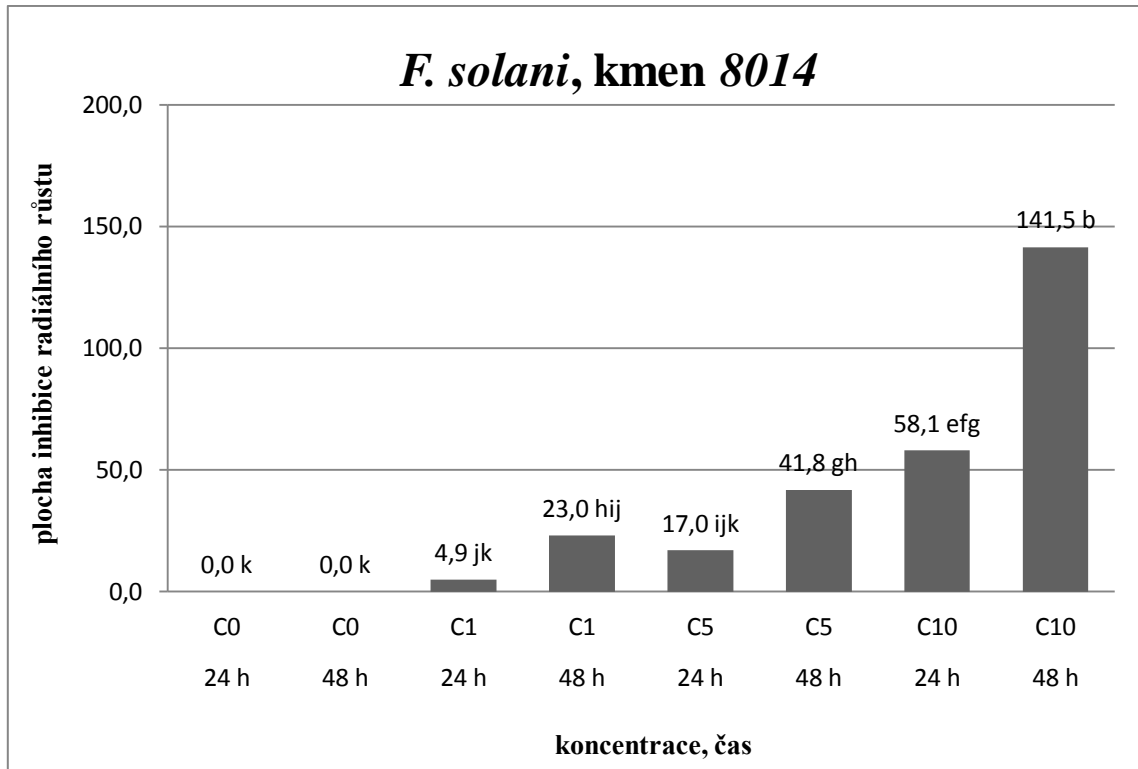
Plocha inhibice radiálního růstu je u *Fusarium solani* kmen 8079 ovlivněna hlavně koncentrací, méně časem jak dokazuje Tukeyho test na obr. 7. V porovnání s ostatními zkoušenými kmeny byla reakce tohoto kmene na testovaný vzorek proteinu nejnižší, tedy byly vytvořeny nejmenší plochy inhibice radiálního růstu.



Obr. 7: Závislost plochy inhibice radiálního růstu na koncentraci proteinu a času (C0=koncentrace 0 mg/mm, C5=5 mg/mm, C10= 10 mg/mm). V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Tukey HSD testu.

5.2.2 Vyhodnocení *Fusarium solani* kmen 8014

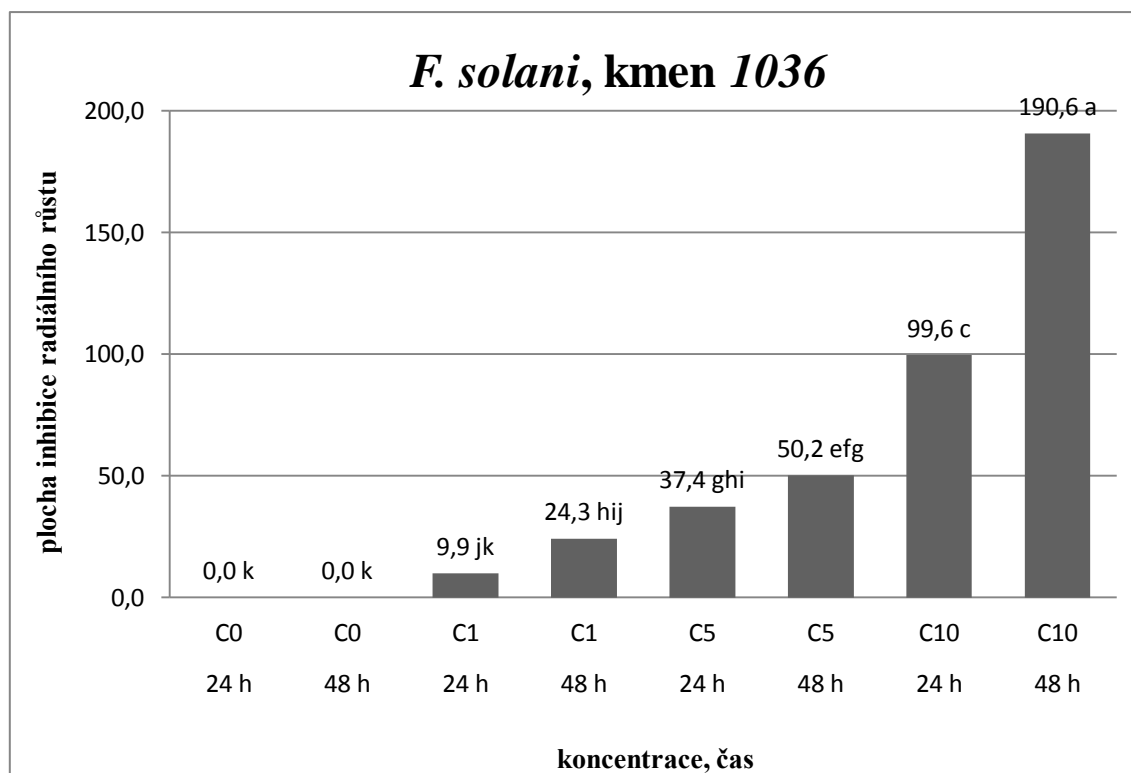
Plocha inhibice radiálního růstu je u *Fusarium solani* kmen 8014 ovlivněna koncentrací, ale na rozdíl od ostatních testovaných houbových kultur je i významně ovlivněna časem (viz obr. 8).



Obr. 8: Závislost plochy inhibice radiálního růstu na koncentraci proteinu a času (C0=koncentrace 0 mg/mm, C5=5 mg/mm, C10= 10 mg/mm). V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Tukey HSD testu.

5.2.3 Vyhodnocení *Fusarium solani* kmen 1036

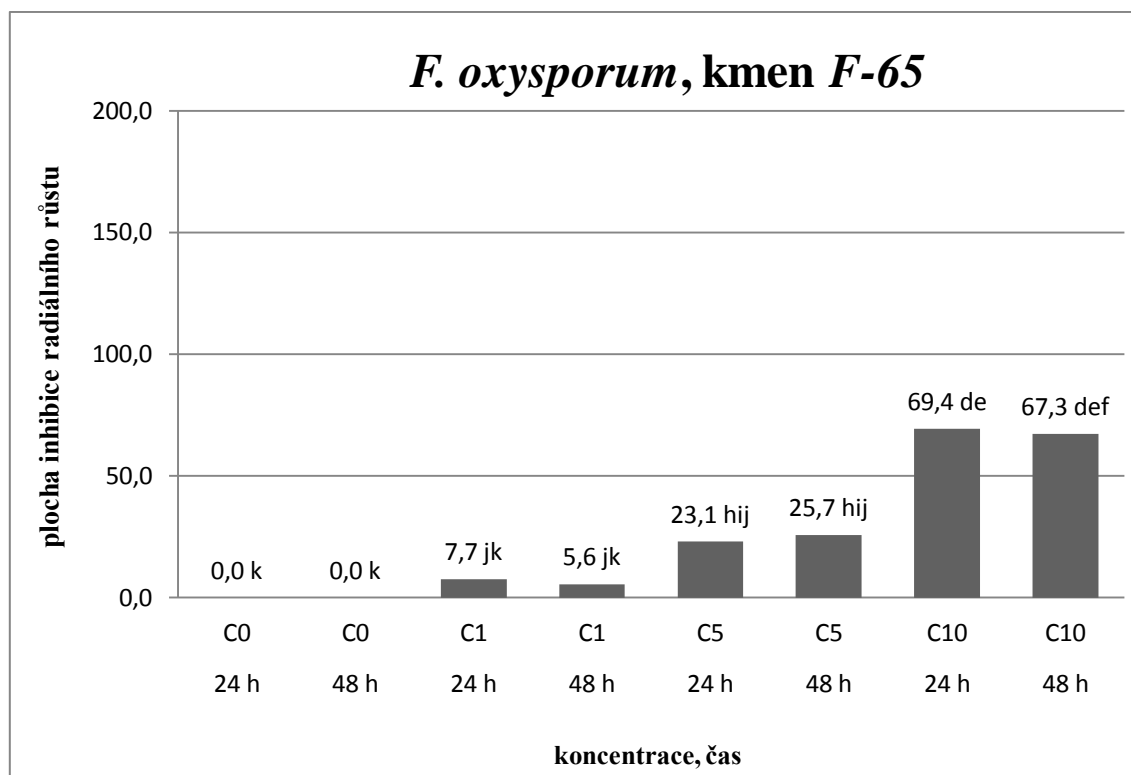
U *Fusarium solani* kmen 1036 je plocha inhibice radiálního růstu je velmi ovlivněna koncentrací aplikovaného roztoku proteinu a při vyšší koncentraci (10 mg/mm) i časem (viz obr. 9). Na tento kmen měl testovaný vzorek proteinu nejvyšší inhibiční účinek z testovaných hub, tedy byly naměřeny největší plochy inhibice radiálního růstu. Oproti ostatním testovaným patogenním houbám byla zaznamenána citlivost vůči proteinu již při nižší koncentraci (1 mg/mm).



Obr. 9: Závislost plochy inhibice radiálního růstu na koncentraci proteinu a času (C0=koncentrace 0 mg/mm, C5=5 mg/mm, C10= 10 mg/mm). V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Tukey HSD testu.

5.2.4 Vyhodnocení *Fusarium oxysporum* kmen *F-65*

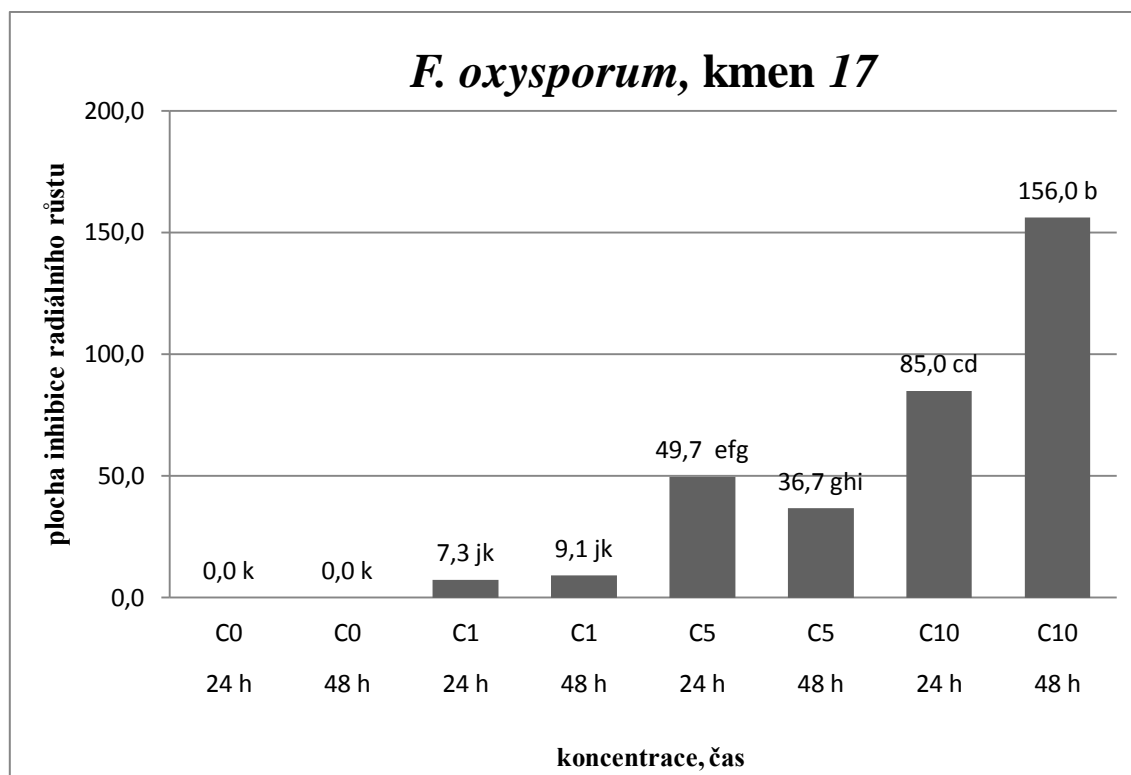
Plocha inhibice radiálního růstu je u *Fusarium oxysporum* kmen *F-65* je ovlivněna koncentrací, při nižší koncentraci je síla testu nízká (viz obr. 10). Plocha inhibice radiálního růstu u tohoto kmene téměř nebyla ovlivněna časem.



Obr. 10: Závislost plochy inhibice radiálního růstu na koncentraci proteinu a času (C0=koncentrace 0 mg/mm, C5=5 mg/mm, C10= 10 mg/mm). V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Tukey HSD testu.

5.2.5 Vyhodnocení *Fusarium oxysporum* kmen 17

U *Fusarium oxysporum* kmen 17 je plocha inhibice radiálního růstu velmi ovlivněna koncentrací, ale faktor času se významněji projevuje až při vyšší koncentraci 10 mg/mm (viz obr. 11).



Obr. 11: Závislost plochy inhibice radiálního růstu na koncentraci proteinu a času (C0=koncentrace 0 mg/mm, C5=5 mg/mm, C10= 10 mg/mm). V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Tukey HSD testu.

6 Diskuze

Výsledky analýzy obou testovaných vzorků pomocí SDS-PAGE ukazují, že jejich proteinové spektrum bylo výrazně ovlivněno, způsobem úpravy (tepelnou koagulací). V práci Bártové & Bárty (2008) je uvedeno, že teplota při zpracování PFJ výrazně ovlivňuje spektrum peptidových resp. proteinových frakcí.

Termostabilní frakce v PFJ, které se nevysrážely při teplotě 80°C jsou převážně inhibitory proteas. Na pracovišti bylo již dříve zjištěno, že v této frakci převažují hlavně serinové inhibitory proteas a inhibitory proteas Kunitzova typu (Bárta, os. sdělení). Studium antimikrobiálních účinků jednotlivých typů inhibitorů proteas je třeba věnovat další pozornost.

Kim et al. (2009) ve své práci také uvádí, že některé bramborové proteiny působí antimikrobiálně. Mezi tyto proteiny autoři řadí např. patatin, dále také defensiny a inhibitory proteas, u nichž popisují výrazné antifungální účinky (hlavně u bramborových inhibitorů proteas I). U inhibitorů Kunitzova typu byl popsán antifungální účinek vůči *Fusarium culmorum* (Sprenskaya et al., 2006).

Na spektrum peptidových frakcí v hlíze má velký vliv odrůda brambor. V této práci byla použita konzumní odrůda Marabel. Bylo by vhodné další testy provádět s průmyslovými odrůdami, jejichž PFJ vzniká jako odpad při získávání škrobu. Tento odpad má potenciál, aby se v budoucnu stal materiálem pro řadu biotechnologických aplikací (Bárta & Bártová, 2008).

Významným faktorem experimentu je houbová kultura. Izolované peptidové frakce z bramboru potlačují houby druhy *Fusarium solani* a *F. oxysporum*. Bylo by vhodné testy rozšířit o další kmeny či druhy hub. Například Seletrennikoff (2001) uvádí, že inhibitory proteas vykazují antifungální aktivitu vůči druhu *Rhizoctonia solani*, rodu *Alternaria* a dalším patogenním houbám.

Dalším předmětem výzkumu by měl být mechanismus účinku, který je jak uvádí zatím neobjasněn. Heřmanová et al. (2006) v práci uvádějí, že byla u inhibitorů proteas popsána biofunkčnost – inhibice trávících enzymů (obránná reakce vůči hmyzím škůdcům) i antifungální aktivita.

7 Závěr

Z výsledků experimentu se dají odvodit následující zjištění a závěry:

- Proteinový vzorek po úpravě tepelnou koagulací měl jiné spektrum peptidových frakcí než vzorek bez této úpravy.
- Spektrum peptidových frakcí po úpravě tepelnou koagulací obsahoval na základě provedené SDS-PAGE výrazně vyšší zastoupení proteinů s nižší molekulovou hmotností (10-15 kDa), pravděpodobně se jedná o serinové inhibitory proteas.
- Vzorek bez úpravy tepelnou koagulací nezpůsobil tvorbu inhibičních radiálního růstu u testovaných patogenů.
- Všechny čtyři testované faktory (úprava proteinu, houbová kultura, koncentrace, čas) měly průkazný přímý vliv na plochu inhibice radiálního růstu.
- V rámci experimentu měla největší vliv na radiální růst interakce mezi faktory úprava proteinového vzorku (teplota koagulace) x koncentrace roztoku proteinu.
- Nejmenší plocha inhibice radiálního růstu byla naměřena u *Fusarium solani* kmen 8079 (průměrná plocha inhibice radiálního růstu je 10 mm²).
- Největší plocha inhibice radiálního růstu byla naměřena u *Fusarium solani* kmen 1036 (průměrná plocha inhibice radiálního růstu je 26 mm²).
- *Fusarium solani* kmen 1036 reagoval i na nižší koncentrace testovaného proteinu, u ostatních kmenů byly tyto reakce malé.

Výsledky ukázaly, že vzorek po úpravě tepelnou koagulací obsahuje nízkomolekulární proteiny, které mohou potlačovat houby z rodu *Fusarium*.

8 Seznam použitých zkratk

SGE.....	Elektroforéza na škrobovém gelu
IEF.....	Isoelektrická fokusace
2D-PAGE.....	Dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SDS-PAGE.....	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí amonického detergentu dodecylsíranu sodného
PDA.....	Potato dextrose agar
PSA.....	Potato sucrose agar
MEA.....	Malt extract agar
ISA.....	Iso-sensitest agar

9 Seznam použité literatury

1. **Ahman I., Melander M. (2003):** Potato proteins, and other plant proteins, as potential transgenic resistance factor to pollen beetles in oilseed rape. *Ann Appl Biol* 143: 253-260 p.
2. **Andrews D. L., Beames B., Summers M. D., Park W. D. (1988):** Charakterization 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 p.
3. **Bárta J., Bártová V. (2008):** Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech J. Food Sci.*, 26: 347-359 p.
4. **Bárta J., Bártová V. (2007):** Proteiny bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 116 p.
5. **Bárta J., Čurn V. (2004):** Proteiny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické Listy* 98: 373-378 p.
6. **Bártová V., Bárta J (2008):** Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. *RES. AGR. ENG.*, 170-175 p.
7. **Castro M.S., Fontes W. (2005):** Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2005, 12, 11-16 p.
8. **Dammne van E. J. M., Barre A., Rougé P., Peumans W. J. (2004):** Potato lectins: an updated model of a unique chimeric plant protein. *The Plant Journal* 37: 34-45 p.
9. **Dennis S., Galliard T. (1974):** Wax ester formation catalyzed by isoenzymes of lipolytic acyl hydrolase. *Phytochemistry* 13: 2469-2473 p.
10. **Desjardins A. E., Proctor R. H. (2007):** Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119: 47–50 p.
11. **Doke N., Nishimura S. (1988):** Activation of O₂ generating reaction in potato plants infected with *Phytophthora infestans*: its mechanism and significance in induced resistance. *Abstract of Papers, 5th Int. Congress Pathol* 229.
12. **Edreva A. (2005):** Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 2005, 31(1-2), 105-124 p.

13. **Habib H., Fazili K. M. (2007):** Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (3), pp. 068-085, August 2007
14. **Hampl F., Rádl S., Paleček J. (2007):** *Farmakochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 448 p.
15. **Hanusová L., Čurn V. (2006):** Inhibitory proteas v hlíze bramboru. *Chem. Listy* 101: 536-541 p.
16. **Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006):** Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chem. Listy* 100, 495 – 500 p.
17. **Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006):** Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chem. Listy* 100: 501-507 p.
18. **Jongsma M. A. (1995):** The resistance of insect to plant proteinase inhibitors. Centre for Plants Breedings and Reproduction. Wageningen. Wageningen university
19. **Jůzl, M., Půlkrábek, J., Diviš, J. (2000):** Rostlinná výroba III (Okopaniny). Skripta pro ZU v Brně, Praze, Českých Budějovicích
20. **Kawakita K., Senda K., Doke N. (1993):** Factors, affecting in vitro activation of potato phospholipase A2. *Plant Sci* 92: 183-190 p.
21. **Kim J.-Y., Park S.-Ch., Hwang I., Cheong H., Nah J.-W., Hahm K.-S., Park Y. (2009):** Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 2860-2872 p.
22. **Kim J.-Y., Park S.-Ch., Kim M.-H., Lim H. -T., Park Y., Hahm K.-S. (2005):** Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 (2005) 921–927 p.
23. **Koningsveld van G. A. (2001):** Pchysico. Chemical and functional properties of potato proteins. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Nerherlands, 147 p.
24. **Kumar G. N. M., Houtz R. L., Knowles N. R. (1999):** Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. *Plant Physiol* 199: 89-99 p.

25. **Lee L., Hanapel D., Mignery G., Shumway J., Park W. (1983):** Control of tuber protein synthesis in potato. In: Golberg R. B. (ed). Plant Molecular Biology, 355-365 p., UNCULA Symp., Alan R. Liss, New York
26. **Lee M. C. S., Scalon M. J., Craik D. J., Anderson M. A. A. (1999):** A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein Nat Struct Biol 6: 6042-6052 p.
27. **Luginbuhl S. (2010):** *Fusarium solani*. A class project for PP728 Soilborne Plant Pathogens. Mycologia 63: 462-477 p.
28. **Macrae A. R., Visicchion J. E., Lanot A. (1998):** Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols. JAOCS 75: 1489-1494 p.
29. **Mignery G. A., Pikaard C. S., Park W. M. (1976):** Molecular characterization of patatin multigene family of potato. Gene 62: 27-44 p.
30. **Mignery G. A., Pikaard C. S., Hannapel D. J., Park W. M. (1988):** Isolation and sequence analysis of cDNA for the major tuber proteins. Nucleic Acids Res 12: 7987-8000 p.
31. **Moreti A. N. (2009):** Taxonomy of the *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, No. 117: 7—13 p.
32. **Peyer C., Boney P., Staudacher E. (2004):** Purification and characterization xylofuranase from potatoes (*Solanum tuberosum*). BBA-Proteins Proteom 1672: 27-35p.
33. **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 p.
34. **Pots A. M., Gruppen H., Diepenbeek van R., Lee van der J. J., Boekel van M. A. J. S., Wijngaards G., Voragen A. G. J. (1999):** The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. J Sci Food Agric 79: 1557-1564 p.
35. **Portieles R., Ayra C., Borrás O. (2006):** Basic insight on plant defensins. Biotecnología Aplicada 2006;23:75-78 p.
36. **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 p.

37. **Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A. (2001):** Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 286–287 p.
38. **Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998):** Fyziologie rostlin. Vydala Academia v Praze, ISBN 80-200-0586-2
39. **Racusen D. (1984):** Lipid acyl hydrolyse of patatin. *Can J Bot* 62: 1640-1644 p.
40. **Racusen D., Foote M. (1980):** A major soluble glycoprotein of potato. *J Food Biochem* 4: 43-52 p.
41. **Racusen D., Weller D. L. (1984):** Molecular mass of patatin, a major potato tuber protein. *J Food Biochem* 8: 103-107 p.
42. **Rozsahl 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 p.
43. **Sedlářová M., Vašutová M. (2004):** Tř. *Ascomycety* – houby vřeckovýtrusné. <http://botany.upol.cz/atlas/system/ascomycetes.php> (2. 1. 2012)
44. **Selitrennikoff C. P. (2001):** Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* July 2001 vol. 67 no. 7 2883-2894
45. **Senda K., Doke N., Kawakita K. (1998):** Effect of mastoparan on phospholipase A2 activity in potato tubers treated with fungal elicitor. *Plant Cell Physiology* 39: 1080-1086 p.
46. **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*. In press *Plant Physiol Bioch.*
47. **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 p.
48. **Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Revina T. A., Gerasimova N. G., Keruchenko Y. A. S., Shevelev A. B., Valueva T. A. (2006):** Heterologous expression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. *Biochemistry (Moscow)*, 11: 1176-1182.
49. **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 p.

50. **Sutton D. A., Fothergill A. W., Rinaldi M. G. (1998):** Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
51. **Vincelli P., Parker G. (1995):** Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by Fusarium Fungi. UK Cooperative extensit servise University of Kentucky – College of Agriculture 121
52. **Wannemacher R. W., Wiener S. L. (1997):** Trichohecene mycotoxins. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare : chapter 34

10 Příloha 1

Tab. 10: Digitální fotografie Petriho misek v čase. Značení Petriho misek: C, D, E, F, J = houbová kultura (viz Tab. 4); 1,2,3,4,5 = číslo opakování; M0 = protein nebyl upraven tepelnou koagulací; M80 = protein byl upraven tepelnou koagulací.

