

JIHOČESKÁ UNIVERZITA v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

Katedra: Rostlinné výroby



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM PROTEINŮ BRAMBOR A HODNOCENÍ JEJICH VLIVU NA
INHIBICI RŮSTU A VÝVOJE HOUBOVÝCH PATOGENŮ**

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

Autor:
Michaela Sáková

2006

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium proteinů brambor (*Solanum tuberosum* L.) a hodnocení jejich vlivu na inhibici růstu a vývoje houbových patogenů“ vypracovala samostatně a na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....

V Českých Budějovicích 23. dubna 2006

Ráda bych poděkovala Ing. Janu Bártovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování diplomové práce. Zároveň mé poděkování patří Ing. Veronice Heřmanové za pomoc při laboratorních analýzách, poskytnutí podkladových materiálů a informací.

Výsledky práce byly získány v rámci řešení grantu GAČR č. 521/03/P06.

OBSAH :

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1. BRAMBOR HLÍZNATÝ A JEHO HLÍZOVÉ PROTEINY	9
3.1.1. CHARAKTERISTIKA DRUHU <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.....	9
3.1.2.CHARAKTERISTIKA HLÍZOVÝCH PROTEINŮ.....	9
3.1.2.1. OBSAH PROTEINŮ V HLÍZÁCH BRAMBOR	10
3.1.2.2. KLASIFIKACE HLÍZOVÝCH PROTEINŮ	10
3.1.2.3. PATATIN	10
3.1.2.4. BRAMBOROVÉ INHIBITORY PROTEÁZ.....	13
3.2. METODY IZOLACE A ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACE ROSTLINNÝCH PROTEINŮ	14
3.2.1. MECHANICKÁ PŘÍPRAVA VZORKU	14
3.2.2. ZÍSKÁNÍ HRUBÉHO PROTEINOVÉHO EXTRAKTU	15
3.2.3. IZOLACE CÍLOVÉHO PROTEINU	15
3.2.3.1. IONTOVÉ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE (IEC)	16
3.2.3.2. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE (AC)	18
3.2.3.3. GELOVÁ FILTRAČNÍ CHROMATOGRRAFIE (GFC)	19
3.2.4. VLASTNÍ ANALÝZA – ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY	20
3.2.4.1. ELEKROFORÉZA.....	21
3.2.5. ZVÝŠENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	23
3.2.5.1. LYOFILIZACE.....	23
3.2.5.2. ULTRAFILTRACE.....	24
3.3. FYTOPATOGENNÍ HOUBY	24
3.3.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	24
3.3.2. VÝZNAM FYTOPATOGENNÍCH HUB.....	25
3.3.3. NEJVÝZNAMNĚJŠÍ PŮVODCI HOUBOVÝCH CHOROB BRAMBOR	25
3.4. INTERAKCE OBRANNÝCH SYSTÉMŮ ROSTLINY S PATOGENNÍM POTENCIÁLEM HUB.....	26
3.4.1. STRESOVÉ PROTEINY	26
3.4.2. MECHANISMUS OBRANNÉ REAKCE.....	27
3.4.3. PROTEINY SOUVISEJÍCÍ S PATOGENEZÍ	28
3.4.3.1. PR-1 PROTEINY	28
3.4.3.2. PR-2 PROTEINY (B-GLUKANÁZY)	29
3.4.3.3. PR-3 PROTEINY (CHITINASY).....	29

3.4.3.4. PR-4 PROTEINY (PROTEINY VÁŽÍCÍ SE NA CHITIN)	30
3.4.3.5. PR-5 PROTEINY (PROTEINY PODOBNÉ THAUMATINU)	30
4. MATERIÁL A METODY	31
4.1. MATERIÁL	31
4.1.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL	31
4.1.2. HOUBOVÉ ORGANISMY	32
4.2. METODIKA	32
4.2.1. PŘÍPRAVA BRAMBOROVÉ ŠŤÁVY	32
4.2.2. IZOLACE CELKOVÉHO PROTEINU	32
4.2.3. PURIFIKACE PROTEINŮ PATATINOVÉHO KOMPLEXU.....	33
4.2.3.1. IONTOVÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE, DEAE (DIETHYLAMINOETHYL)	33
4.2.3.2. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE, CON -A (CONCAVALIN -A).....	33
4.2.4. ÚPRAVA ZÍSKANÉHO PROTEINU - ODSOLOVÁNÍ A STERILIZACE.....	34
4.2.5. CHARAKTERIZACE HLÍZOVÝCH PROTEINŮ POMOCÍ ELEKTROFORETICKÝCH TECHNIK.....	34
4.2.5.1. SDS-PAGE	34
4.2.5.2. NATIVE-PAGE.....	35
4.2.5.3. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE.....	37
4.2.6. ANTIFUNGÁLNÍ TESTY - HODNOCENÍ INHIBIČNÍHO VLIVU PROTEINU	37
4.2.6.1. INOKULACE A KULTIVACE HOUBOVÝCH ORGANISMŮ	37
4.2.6.2. PŘÍPRAVA KONIDIOVÉ SUSPENZE.....	38
4.2.6.3. METODY STANOVENÍ ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITY PROTEINU.....	38
5. VÝSLEDKY	41
5.1. POPIS CELKOVÉHO PROTEINU.....	41
5.1.1. ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU	41
5.1.2. VÝSLEDKY	41
5.1.3. ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ POPISU CELKOVÉHO PROTEINU	42
5.2. PURIFIKACE PATATINU.....	43
5.2.1. ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU	43
5.2.2. VÝSLEDKY.....	43
5.2.3. ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ PURIFIKACE PATATINOVÝCH BÍLKOVIN.....	44
5.3. CHARAKTERIZACE PURIFIKOVANÉHO PATATINU	45
5.3.1. ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU	45

5.3.2. VÝSLEDKY	46
5.3.3. ZHODNOCENÍ CHARAKTERIZACE PURIFIKOVANÉHO PATATINU	50
5.4. ANTIFUNGÁLNÍ TESTY	51
5.4.1. ZÁKLADNÍ ÚDAJE K POKUSU	51
5.4.2. VÝSLEDKY	51
5.4.3. ZHODNOCENÍ ANTIFUNGÁLNÍCH TESTŮ	61
6. DISKUSE	63
6.1. CHARAKTERISTIKY CELKOVÉHO HLÍZOVÉHO PROTEINU .	63
6.2. PURIFIKACE PATATINU A JEHO CHARAKTERISTIKY	64
6.3. HONOCENÍ VLIVU CELKOVÉHO PROTEINU A PATATINU NA VYBRANÉ DRUHY FYTOPATOGENNÍCH HUB.....	65
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

1. ÚVOD

Brambory jsou díky tomu, že obsahují poměrně vysoký obsah škrobu a vitamínů významnou zemědělskou plodinou. Podílejí se na výživě lidí a jsou také důležitou surovinou pro průmyslové zpracování. Kromě škrobu, vitamínů a minerálních látek obsahují bramborové hlízy také dusíkaté látky, včetně proteinů.

Tyto proteiny mají vysokou biologickou hodnotu, která je dána příznivým zastoupením esenciálních aminokyselin. V posledních letech byla u některých z nich navíc pozorována schopnost omezovat až inhibovat růst fytopatogenních hub (TERRAS 1994, SELITRENNIKOFF 2001, THEIS & STAHL 2004). Studium těchto antifungálních účinků nabývá stále více na významu především z následujících důvodů: Přítomnost proteinů s antifungálním působením byla prokázána u rostlin, hmyzu, mikroorganismů a dokonce i u vyšších organismů včetně člověka, u kterých tvoří součást vrozené imunity (THEIS & STAHL 2004). Vzhledem k širokému rozšíření těchto proteinů existuje možnost jejich využití proti houbovým patogenům nejen v humánní a veterinární medicíně, potravinářství a jiných odvětvích průmyslu, ale i v oblasti ochrany rostlin, kde má stále prioritní postavení chemie.

Použití pesticidů s sebou kromě několika výhod (okamžité působení po aplikaci přípravku, možnost preventivního užití, nižší pracnost) nese i nevýhody. Jde například o vysokou finanční náročnost (nejvyšší sumy peněz jsou utráceny za herbicidy, fungicidy zaujímají ve výčtu nákladů na chemickou ochranu hned druhé místo). Tyto finanční výdaje ztlačují rentabilitu pěstování. Navíc se v současnosti stále více zohledňuje možná přítomnost reziduí pesticidů nejen v půdě, ale i v potravinách a její dopad na životní prostředí, zdraví člověka a zvířat. Vyvíjejí se stále odolnější rasy patogenů, na které již mnohé chemické přípravky neúčinkují.

Z výše uvedených důvodů se studium antifungálních proteinů jeví jako velice perspektivní. V oblasti biologie by jejich využití teoreticky mohlo rozšířit možnosti obrany proti houbovým patogenům. Očekává se, že v oblasti ochrany rostlin studium těchto proteinů pomůže objasnit otázku, zda by jejich použití mohlo potenciálně vést k regulaci či eliminaci napadení rostlin některými fytopatogenními houbami.

2. CÍL PRÁCE

Hlavním úkolem této diplomové práce byla v první řadě izolace celkového hlízového proteinu a glykoproteinu patatinu z hlíz vybraných odrůd Bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) pomocí chromatografických technik. U získaných izolátů celkového proteinu bylo charakterizováno elektroforetické spektrum v denaturovaném stavu, molekulová hmotnost dvou hlavních frakcí (patatinu a inhibitorů proteáz) a jejich procentický podíl z obsahu celkového proteinu. U izolátů patatinu byly charakterizovány základní vlastnosti - molekulová hmotnost, izoelektrický bod, elektroforetické spektrum v nativním a denaturovaném stavu a dále enzymová (esterázová) aktivita.

Následovalo hodnocení vlivu izolátů celkového hlízového proteinu a izolátů patatinu z jednotlivých odrůd na modelové systémy vybraných fytopatogenních hub. Po založení těchto modelových systémů a aplikaci jednotlivých izolátů proteinu byly u kontrolních a ovlivněných populací patogenů ověřovány morfologické a fyziologické ukazatele - radiální růst mycelia, změny v jeho zbarvení a životaschopnost reprodukčních propagujících (u druhu *Fusarium solani*) s cílem rozšířit dosavadní poznatky o vlivu hlízových proteinů brambor (*Solanum tuberosum* L.) na růst a vývoj těchto patogenů.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. BRAMBOR HLÍZNATÝ A JEHO HLÍZOVÉ PROTEINY

3.1.1. Charakteristika druhu *Solanum tuberosum* L.

Brambor hlíznatý patří do rodu lilek - *Solanum* Tourn. a čeledě lilkovitých - *Solanaceae* Pers. (RYBÁČEK 1988). Jeho původní výskyt je vázán na Jižní Ameriku, odkud byl také roku 1565 poprvé dovezen přes Španělsko do Evropy jako vzácná okrasná rostlina příbuzný druh (*Solanum anndigenum*). Teprve po roce 1585, kdy byl do Anglie dovezen druh *Solanum tuberosum*, se brambory na evropském kontinentu začaly postupně využívat k výživě obyvatel (JŮZL et al. 2000).

Ve fylogenezi kulturních, tetraploidních druhů bramboru mají největší význam 2 vývojová centra: Andské centrum, ve kterém se z planě rostoucích diploidních forem vyvinul druh *Solanum andigenum* a Chilské centrum, kde vznikl předchůdce evropských odrůd bramborů, druh *Solanum tuberosum* (RYBÁČEK 1988).

Historie pěstování brambor je již dávno spojena s kulturou člověka – uplatnění druhů rodu *Solanum* jako hlavní potraviny obyvatel And bylo prokázáno již 2000 let před příchodem Španělů. Naopak na území Čech jsou dochovány první záznamy o polním pěstování brambor až z poloviny 17. století. K většímu rozšíření ploch (a zamezení častým hladomorům) došlo počátkem 19. století. Největší rozsah pěstování brambor byl u nás zaznamenán před druhou světovou válkou (JŮZL et al. 2000).

V současnosti zaujímají sklizňové plochy brambor v České republice plochu kolem 45000 ha (z toho přibližně 7000 ha připadá na konzumní brambory ranné, 27500 ha na konzumní brambory pozdní, 6000 ha na brambory průmyslové a 4500 ha na sadbu) (VOKÁL 2005).

3.1.2. Charakteristika hlízových proteinů

Hlízové proteiny tvoří spolu s aminokyselinami, amidy, různými bázemi a anorganickými sloučeninami komplex dusíkatých látek bramborových hlíz. Jsou považovány za nejdůležitější složku tohoto komplexu a z biologického hlediska představují jedny z nejhodnotnějších proteinů rostlinného původu. Především díky svému vysokému obsahu esenciálních aminokyselin se přibližují svou hodnotou k vaječným proteinům (ANONYM 1. 1986).

3.1.2.1. Obsah proteinů v hlízách brambor

Obsah dusíkatých látek včetně proteinů v hlízách brambor závisí především na odrůdě, hnojení, agrotechnických a klimatických podmínkách (SHEWRY 2003). Obvykle se pohybuje kolem 2% v čerstvé hmotě (10% v sušině), což řadí brambory k plodinám se středním obsahem proteinů (DEBRE & BRINDZA 1996).

Podíl čistého proteinu v obsahu dusíkatých látek může kolísat pod vlivem výše zmíněných faktorů v poměrně značném rozpětí: od 34 do 70% (SHEWRY 2003).

3.1.2.2. Klasifikace hlízových proteinů

V současné době převažuje klasifikace hlízových proteinů podle molekulové hmotnosti. Na jejím základě je lze členit na tři hlavní skupiny (POTS et al. 1999):

1. patatin neboli patatinový komplex
2. bramborové inhibitory proteáz
3. ostatní proteiny, především proteiny enzymovou účastí na syntéze škrobu

První dvě skupiny představují přes dvě třetiny obsahu proteinů v bramborových hlízách (BÁRTA & ČURN 2004).

3.1.2.3. Patatin

Základní charakteristika

Patatin je název pro rodinu imunologicky úzce příbuzných glykoproteinů izolovaných poprvé v roce 1981 Racusenem a Footem pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie. Považuje se za hlavní zásobní protein hlíz brambor, vykazující multienzymovou aktivitu, především aktivitu β -1,3–glukanázy, nescifické lipid acyl hydrolázy a fosfolipázy A₂. Díky těmto vlastnostem je patatin zřejmě významnou složkou obranného mechanismu rostlin (BÁRTA & ČURN 2004).

Ve zralých bramborových hlízách obvykle tvoří 20 – 40 % rozpustných proteinů (JIMENEZ et al. 2002, RYDEL et al. 2003), ale POTS et al. (1999) uvedli ještě vyšší podíl – až 60 %.

Chemické vlastnosti

V nativní formě je patatin považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa (RACUSEN 1984), resp. 88 kDa (BÁRTA & ČURN 2004). Původně zjištěná molekulová hmotnost monomeru čítajícího 366 aminokyselin (STIEKEMA et al. 1988) byla totiž 40 kDa,

ale dalším studiem se prokázalo, že patatin je pravděpodobně *in vivo* syntetizován jako větší prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa a následně upravován prostřednictvím signálního peptidu, který je tvořen 23 aminokyselinami (MIGNERY et al. 1984). Gen pro patatin tedy kóduje protein o velikosti 43 kDa, nicméně ten je díky posttranslačním úpravám (vystřížení šesti intronů) ve finální podobě o 2,5 kDa kratší (ROSAHL et al. 1986).

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

Fyziologické vlastnosti

Patatin je zřejmě přítomný ve vakuolách parenchymu ve všech odrůdách brambor (HIRSCHBERG et al. 2001, BÁRTA & ČURN 2004). Vzhledem k vysoké akumulaci v hlízách je považován za zásobní protein (TONÓN et al. 2001). Potvrzuje to i skutečnost, že v průběhu skladování hlíz a při jejich klíčení dochází k postupnému snižování obsahu tohoto proteinu (POTS et al. 1999).

V listech, stoncích a kořenech se patatin oproti vysokému obsahu v hlízách vyskytuje pouze ve stopových množstvích, což je také charakteristické pro zásobní proteiny hlíz (SHEWRY 2003).

Patatin však neplní pouze úlohu zásobní bílkoviny. ANDREWS et al. (1988) se domnívají, že je potřebný pro produkci fytoalexinu, látky produkované rostlinami při obraně proti infekcím. LIU et al. (2003) prokázali jeho významnou antioxidační a antiradikálovou aktivitu. Tím potvrdili zjištění Al - Saikhana, že mezi antioxidy brambor se patatin řadí na druhé místo, hned za kyselinu L - askorbovou (AL – SAIKHAN et al. 1995).

Patatin má v ojedinělých případech též schopnost vyvolat alergické reakce především u kojenců (MAJAMAA et al. 2001) a dětí. Je velmi pravděpodobné, že se u nich tento alergen podílí na vzniku atopického exému (SCHMIDT et al. 2002). Alergenicitu patatinu je možné snížit tepelnou úpravou brambor, kterou dochází k agregaci s ostatními hlízovými proteiny (SEPALLA et al. 1999). Přesto i takto stabilizovaný protein vyvolává tvorbu imunoglobulinů E, kterými se tělo vůči patatinu brání (MAJAMAA et al. 2001).

Do fyziologických vlastností charakterizujících patatin patří též jeho enzymová aktivita. Vzhledem k jejímu většímu rozsahu je popsána v následující kapitole.

Enzymová aktivita

Vědci se stále více shodují v myšlence, že je patatin zřejmě významným faktorem obranyschopnosti rostlin. K tomuto závěru jsou vedeni především objevem široké hydrolázové aktivity tohoto proteinu. U všech patatinových izoform se konkrétně jedná o katalyzaci hydrolýzy fosfolipidů, glykolipidů, monoacylglycerolů a diacylglycerolů (SHARMA et al. 2004).

Obecně hydrolázy katalyzují štěpení chemických vazeb za účasti vody. Jsou obsaženy téměř ve všech živočišných tkáních, rostlinných pletivech i mikrobiálních buňkách (PROCHÁZKOVÁ 1996).

U patatinu byla objevena současně aktivita tří hydroláz: Nejdéle je známá aktivita nescifické lipid acyl hydrolázy (RACUSEN 1984), novější je již objev β -1,3-glukanázy (TONÓN et al. 2001). Někteří autoři (SENDA et al. 1996) též došli k závěru, že cytosolová fosfolipáza A₂ (PLA₂) má vysokou homologii N – koncové sekvence polypeptidového řetězce s patatinem, stejnou molekulovou hmotnost (40 kDa) i izoelekterický bod (4,75) jako tento protein. RYDEL et al. (2003) navíc zjistili shodu v aktivních místech PLA₂ a patatinu. Považují proto hlízový enzym s PLA aktivitou za patatin.

Poslední z dosud známých katalytických funkcí patatinu je acyltransferázová aktivita, tj. schopnost přenosu zbytků kyselin z jedné sloučeniny na druhou (BÁRTA & ČURN 2004).

Lipid acyl hydroláza a fosfolipáza A₂

Činností lipid acyl hydrolázy i fosfolipázy A₂ dochází k hydrolytickému štěpení esterů na alkohol a kyselinu.

Lipid acyl hydroláza hraje díky této schopnosti důležitou roli při tvorbě voskových esterů a při deacylaci lipidů, což má zřejmě význam v obranných mechanismech rostlin. Produkce toxických mastných kyselin a vosků může například inhibovat invazi houbových patogenů (RACUSEN 1984).

Hydrolytická enzymová aktivita patatinu se však s největší pravděpodobností nepodílí jen na obraně rostliny proti fytopatogenním houbám, ale i proti hmyzím škůdcům. Zjistilo se, že patatin po přidání do připravené potravy inhibuje růst larev mnoha druhů hmyzu (AHMAN & MELANDER 2003). Tento efekt byl vysvětlen cytotoxickou oxidací mastných kyselin hydrolyzovaných právě tímto proteinem (STRICKLAND et al. 1995).

Cytosolová fosfolipáza A₂ (PLA₂) katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn* – 2 u diacylfosfolipidů (SENDA et al. 1996). Účastní se také na signální transdukci, vyvolávající rezistentní reakci v bramborových buňkách při inokulaci

inkompatibilní rasou houbového patogena *Phytophthora infestans* (SENDA et al. 1998), účinně inhibuje též klíčení spor tohoto patogena v podmínkách *in vitro* (SHARMA et al. 2004).

β-1,3-glukanáza

β -1,3-glukanázy existují v četných formách v množství rostlinných druhů včetně hrachu, tabáku, fazolů, cizrny, rajčat, kukuřice a brambor (TONÓN et al. 2001). Jsou přítomné i u hub a bakterií, u kterých však mají odlišnou aminokyselinovou sekvenci než u vyšších rostlin (proto byly zařazeny do glykosyl hydrolázové rodiny číslo 16) a plní i jiné funkce. Bakteriím umožňují asimilaci β -1,3-glukanů jako potravního zdroje, v houbách jsou zahrnuty v několika biologických procesech jako je rozpínání buněk a uvolňování spor (HONG & MENG 2003).

β -1,3-glukanázy vyšších rostlin patří do glykosyl hydrolázové rodiny číslo 17, která má dobře definovanou sekvenci aminokyselin. Nejlépe zachovalá oblast v sekvenci těchto enzymů je lokalizována v jejich centrální části. Zde se nachází zbytek tryptofanu, který může být zapojen do interakce s glukanovými substráty (TONÓN et al. 2001). β -1,3-glukanázy vyšších rostlin tedy jsou schopné katalyzovat hydrolýzu β -1,3-glykosidických vazeb β -1,3-glukanů, které jsou mimo jiné nejhojnější složkou buněčných stěn hub. Z tohoto důvodu jejich hydrolýza oslabuje mechanickou pevnost buněčných stěn, což obvykle vyústí až v lyzi houbových buněk (HONG & MENG 2003) a efektivně zamezí růstu hub testovaných *in vitro* (TONÓN et al. 2001). Díky této schopnosti jsou β -1,3-glukanázy považovány za jednu ze složek obranného mechanismu rostlin proti houbovým patogenům (HONG & MENG 2003).

Další vlastností, svědčící o roli těchto rostlinných hydroláz v rezistenci rostlin je, že pravděpodobně slouží k indukci systému antimikrobiální ochrany (TONÓN et al. 2001). Napovídají tomu nejen kladné zkušenosti po vnesení rostlinných genů pro β -1,3-glukanázu do tabáku, ale i fakt, že rostliny několik tříd β -1,3-glukanáz produkují jako odpověď na invazi patogena a okolní stres (HONG & MENG 2003).

3.1.2.4. Bramborové inhibitory proteáz

Inhibitory proteáz představují obvykle 20 – 30% extrahovatelných bílkovin hlíz (POTS et al. 1999). POUVREAU (2004) však našel u odrůdy *Elkana* asi 50% podíl inhibitorů proteáz z rozpustných bílkovin hlízové šťávy.

Inhibitory proteáz hrají u rostlin významnou roli v obranných mechanismech proti atakujícímu hmyzu a mikroorganismům inhibicí jejich specifických proteáz (BÁRTA & ČURN 2004). U rostlinných druhů z čeledi *Solanaceae* bylo charakterizováno několik proteázových

inhibitorů. Nejpočetnější skupinu tvoří inhibitory Kunitzova typu, které představují přibližně 44 % ze všech bramborových inhibitorů proteáz (POUVREAU 2004). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 18 – 24 kDa a primárně vykazují specifitu vůči trypsinu. Následují inhibitory Bowmanova-Birkova typu s molekulovou hmotností v rozmezí 6 – 10 kDa vykazující specifitu vůči trypsinu a chymotrypsinu, inhibitory cathepsinu D a cystatinové inhibitory. Syntéza všech těchto proteázových inhibitorů v litech rostlin je indukovatelná poraněním, zatímco v zásobních orgánech (hlízy brambor) se akumulují jako zásobní bílkoviny (BÁRTA & ČURN 2004).

3.2. METODY IZOLACE A ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACE ROSTLINNÝCH PROTEINŮ

Pro detailní studium konkrétního proteinu je třeba jej získat v čistém stavu, tzn. prostřednictvím různých metod odstranit nežádoucí doprovodné složky, které by později mohly ovlivnit jeho funkci (KORNBERG 1990). Cílem izolace však není jen získání homogenního proteinu, velice důležité je též zachování jeho biologické aktivity.

Odstranění nežádoucích doprovodných složek od cílového proteinu (purifikace proteinu) obvykle probíhá v několika krocích:

- Mechanická příprava vzorku
- Získání hrubého proteinového extraktu
- Izolace cílového proteinu
- Vlastní analýza proteinu
- Zvýšení koncentrace proteinu

3.2.1. Mechanická příprava vzorku

Buněčné stěny rostlinných buněk vynikají svou vysokou pevností a odolností, způsobenou především přítomností celulósových mikrofibril a amorfních hmot - hemicelulóz, pektinů a bílkovin (ROSYPAL 1994).

K zpřístupnění potřebného proteinu je nutné tyto buněčné stěny určitým způsobem narušit, k čemuž se u většiny fibrilárních materiálů využívá zmrazení, následné rozdrčení vybraných rostlinných orgánů a hrubá filtrace získané rostlinné šťávy (GEGENHEIMER 1990).

3.2.2. Získání hrubého proteinového extraktu

Metody získání hrubého proteinového extraktu mohou být různé. Ve velkovýrobě se nejčastěji používají způsoby na bázi tepelné a kyselé precipitace, které jsou však z hlediska zachování biologických vlastností proteinů nevyhovující. V tomto směru se jako nejperspektivnější jeví metody precipitace proteinů z hlízové vody prostřednictvím nízkomolekulárních aditiv (různé kyseliny, soli kovů a organická rozpouštědla – především ethanol), které umožní zachování opětovné rozpustnosti precipitovaných proteinů (BÁRTA & ČURN 2004).

Precipitaci proteinů předchází získání hlízové vody (bramborová šťáva zbavená většiny škrobu) pomocí odstředění bramborové šťávy na centrifuze. Hlízová voda je mimo jiné jedním z odpadních produktů při zpracování brambor na škrob.

3.2.3. Izolace cílového proteinu

Pro izolaci proteinů se v současné době používají především chromatografické metody, které jsou selektivní, účinné a díky své šetrnosti umožňují získat čistou a nativní bílkovinu, tzn. homogenní preparát s plnou biologickou aktivitou. Základním principem chromatografie je opakované ustalování rovnováhy rozpuštěné látky mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Vzhledem k tomu, že rovnováha se ustavuje mnohokrát, dají se rozdělit i látky, které se v afinitě k těmto fázím liší jen nepatrně (PROSSER et al. 1989).

K získání čistého proteinu obvykle nestačí jen jedna chromatografická technika, vhodné je použít více různých technik následujících po sobě (např. při izolaci patatinu IEC, AC a GFC – přehled zkratk viz Tab. I). Na závěr izolace je obvykle zapotřebí provést odsolení roztoku proteinu (tzv. desalting), kterým se většinou zbavujeme solí použitých v předchozích chromatografických procedurách (POHL 1990). Techniky nejčastěji používané pro izolaci a odsolení proteinů jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Přehled technik nejčastěji používaných pro izolaci a odsolení proteinů

Technika	Zkratka	Princip	Využití při purifikaci
Iontově výměnná chromatografie	IEC	dělení molekul rozpuštěné látky na základě opakovaného ustalování rovnováhy této látky mezi dvěma fázemi	izolace proteinu + odsolení
Afinitní chromatografie	AC		izolace proteinu
Gelová filtrační chromatografie	SEC		izolace proteinu + odsolení
Chromatografie na obrácené fázi	RP (HPLC)		izolace proteinu + odsolení
Dialýza	-	dělení molekul podle velikosti pórů semipermeabilní membrány	odsolení
Ultrafiltrace	-		odsolení
Elektroforéza	-	dělení molekul podle velikosti jejich náboje ve stejnosměrném elektrickém poli	odsolení

Modifikováno podle POHL 1990

3.2.3.1. Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Iontově výměnná chromatografie je určena pro separaci látek nesoucích kladný nebo záporný náboj (ANONYM 2. 2006). V případě separace proteinů využívá skutečnosti, že proteiny jsou amfolyty a mají tedy pozitivní i negativní náboje. Pozitivní náboje jsou způsobeny ionizací lyzinových a argininových zbytků, negativní ionizací zbytků kyseliny glutamové a asparagové. Protože je ionizace těchto skupin závislá na pH, je na pH závislý i čistý náboj proteinu (ROSSOMANDO 1990). Proto je velice důležitá znalost izoelektrického bodu (pI) purifikovaného proteinu (hodnota pH, při které se náboj proteinu ztrácí), podle něhož se určuje pH pufrů použitých v IEC. Izoelektrický bod však není jediným kritériem pro stanovení pH prostředí – nutné je přihlédnout i k velikosti disociační konstanty ionogenní skupiny (PROSSER et al. 1989). Průběh separace proteinů podle pH prostředí a izoelektrických bodů daných proteinů je popsán v Tab. II.

Tab. II: Průběh separace proteinů

pH prostředí	Náboj proteinu	Separace na nosiči
pH < pI	protein nese kladný náboj	separace na katexu
pH > pI	protein nese záporný náboj	separace na anexu
pH = pI	celkový náboj proteinu je nulový	nelze provést IEC

Modifikováno dle ANONYM 2. 2006

Podobně jako ostatní typy kapalně chromatografie má i iontově výměnná chromatografie stacionární a mobilní fázi. Stacionární fázi obvykle představuje pevný skelet – nejčastěji syntetický polymer (celulóza, dextran, agaróza nebo polystyren) (ROSSOMANDO 1990), na který jsou navázány ionizovatelné skupiny, tzv. iontoměniče neboli ionexy (VODRÁŽKA 1982). Purifikace proteinu při IEC tedy probíhá prostřednictvím separace bílkoviny pomocí ionexů, a to ve dvou krocích. Prvním je navázání proteinu na fixované náboje (pomocí elektrostatické interakce mezi fixovanými náboji ionexu a náboji na proteinu) a druhým uvolnění nebo přemístění proteinu z ionexu (ROSSOMANDO 1990).

Aby se protein z ionexu uvolnil, je třeba použít eluční pufr o vyšší iontové síle (docílí se např. přidávkem NaCl). Protože afinita iontů k ionexu závisí na velikosti náboje, zvětší se afinita iontů elučního roztoku k aktivním centrům ionexu a doposud vázaný protein je takto vytěsněn (PROSSER et al. 1989).

Měniče iontů (ionexy)

Iontoměniče jsou v podstatě nerozpustné polyelektrolyty, schopné s různou afinitou vázat různé ionty z roztoku (VODRÁŽKA 1982). Podle druhu měněných iontů se dělí na katexy a anexy.

Katexy jsou polyvalentní aniony schopné ve vodných roztocích elektrolytů vyměňovat kationty. Silné katexy obsahují sulfoskupinu [-SO₃H], slabé karboxyl [-COOH] nebo fenolický hydroxyl. Anexy jsou polyvalentní kationty schopné ve vodných roztocích elektrolytů vyměňovat aniony. Silné anexy mají kvartérní amoniovou skupinu [-N⁺(CH₃)₃], slabé terciální nebo sekundární aminoskupinu [-NR₂, -NHR] (PROSSER et al. 1989).

Výběr ionexu

Výběr ionexu pro chromatografii proteinů závisí na stabilitě proteinu a především na jeho izoelektrickém bodě (pI). Při tomto pH je protein jako celek elektroneutrální, na ionexu se nebude prakticky vázat. Optimální sorpce nastává při pH, které se liší od pI o 1 pH jednotku. Při nižším pH má protein kladný náboj a váže se na katex, při vyšším naopak (PROSSER et al. 1989).

3.2.3.2. Afinitní chromatografie (AC)

Afinitní chromatografie je biospecifická technika, která při dělení molekul proteinů využívá řady jejich vlastností - především hydrofobie, izoelektrického bodu, velikosti a tvaru molekul a specifických vratných interakcí mezi molekulami (OSTROVE & WEISS 1990). Díky těmto vlastnostem jsou proteiny schopné vytvářet specificky a reverzibilně komplexy s určitými látkami, tzv. afinitními ligandy (ANONYM 2. 2006). K uvolnění proteinů z vazby na ligand dochází opět prostřednictvím elučního pufru obsahujícího např. NaCl. Ligand bývá podobně jako ionex v IEC navázán na pevný skelet, tzv. matrix - stacionární fázi, tvořenou nejčastěji syntetickým polymerem (OSTROVE & WEISS 1990).

Pro izolaci cílového proteinu se obvykle volí specifická matrix i ligand. Při purifikaci glykoproteinů hraje důležitou roli tzv. lektinová afinitní chromatografie (GERALD 1990).

Lektinová afinitní chromatografie

V lektinové afinitní chromatografii se jako ligandy uplatňují lektiny (např. čočkový a burský lektin, aglutinin ze sojových bobů a pro purifikaci patatinu Concavalin A).

Lektiny jsou proteiny nacházející se především v rostlinách, ale jejich existence byla prokázána i v jiných organismech. Obecně jsou tyto proteiny schopny se ochotně, ale reverzibilně vázat na speciální uhlovodíkové sekvence glykoproteinů.

Ačkoliv je lektinová afinitní chromatografie metoda rychlá a účinná, k úplné purifikaci proteinů stačí zřídka. Obvykle se proto používá v situacích, kdy je k dispozici pouze malé množství proteinu a je vyžadována multikroková purifikační procedura (GERALD 1990).

Výběr ligandu

Pro purifikaci bílkovin by měla být disociační konstanta (K_L) komplexu ligand – bílkovina $K_L < 10^4$. Při afinitní chromatografii, kdy je ligand kovalentně vázán na pevný skelet, je tvorba komplexu ztížena prostorovými překážkami ve srovnání s interakcemi v roztoku. Proto se ligand často umísťuje na konci uhlovodíkového řetězce (s 6 až 8 uhlíky), což jej značně zpřístupní (PROSSER et al. 1989).

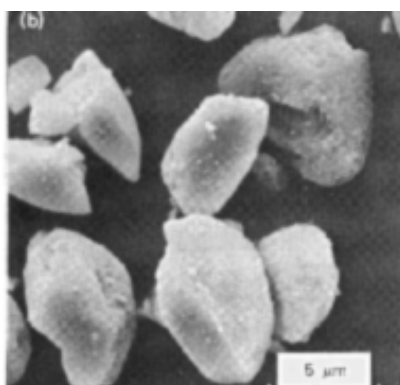
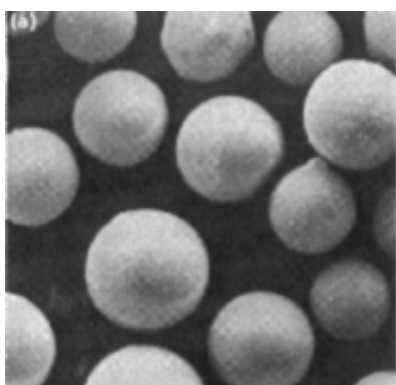
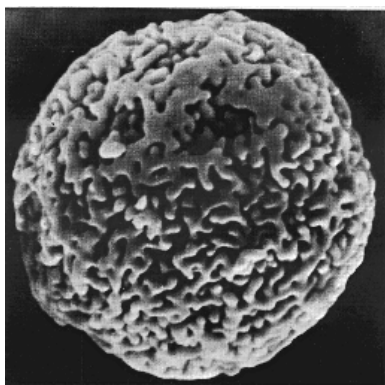
3.2.3.3. Gelová filtrační chromatografie (GFC)

Gelová filtrační chromatografie (neboli gelová filtrace) je další z technik doporučených pro purifikaci proteinů (POHL 1990). Principem této metody je separace proteinových molekul podle jejich velikosti (molekulové hmotnosti) a tvaru (ANONYM 2. 2006). Její použití je výhodné též při odsolování roztoků proteinů (POHL 1990).

V případě gelové chromatografie se jedná o druh rozdělovací chromatografie v systému kapalina – kapalina. Stacionární fází je kapalina zakotvená v gelu (Obr. I), nejčastěji dextranovém (obchodní název je Sephadex). Tímto zakotvením je zajištěna nemísitelnost s mobilní fází, kterou bývá voda nebo pufr, zajišťující pohyb separovaných molekul (ANONYM 2. 2006).

Výsledkem separace je, že větší molekuly nevstupují do pórů gelu, jejich retenční čas je malý (z kolony se uvolní nejdříve), zatímco menší molekuly vstupují do pórů gelu (a uvolní se později) (STELLWAGEN 1990).

Obr. I: Částice sorbentu



Převzato z ANONYM 2. 2006

Pro odsolování roztoků proteinů se GFC využívá především v situacích, kdy potřebujeme zachovat biologickou aktivitu proteinu či enzymu. Média pro gelovou filtraci proteiny váží slabě (což omezuje ztráty proteinu absorpcí či jeho poškození), jsou kompatibilní prakticky se všemi rozpouštědly a pufrů použitými při chromatografii a díky své zdokonalené chemické a fyzikální stabilitě dovolují vratné a rychlé odsolení labilních proteinů (POHL 1990).

3.2.4. Vlastní analýza – základní charakteristiky

Správný průběh purifikačního procesu a tím i čistotu proteinu je možné ověřit pomocí elektroforézy. Při použití standardů o známé molekulové hmotnosti je možno zhruba stanovit molekulovou hmotnost izolovaného proteinu. Dále lze prostřednictvím této techniky

charakterizovat i jiné vlastnosti sledovaného proteinu, např. izoelektrický bod či enzymovou aktivitu.

3.2.4.1. Elektroforéza

Elektroforéza slouží především k dělení látek biologického původu - bílkovin, nukleových kyselin a jejich složek, polysacharidů, tkáňových extraktů i buněk (PROSSER et al. 1989). Principem tohoto dělení je, že ve stejnosměrném elektrickém poli putují elektricky nabitě částice podle povahy svého náboje buď ke kladné elektrodě (anodě) nebo k záporné elektrodě (katodě) v tekutém médiu – elektrolytu (ČERNÝ & ŠAŠEK 1998). Přehled nejčastějších aplikací jednotlivých elektroforetických technik je uveden v Tab. III.

Velikost náboje jednotlivých částic či molekul určuje rychlost jejich pohybu v elektrickém poli (tzv. mobilitu) a jejich následné rozdělení do jednotlivých frakcí (WESTERMEIER 1993). U amfoterních iontů, jako jsou bílkoviny, závisí velikost náboje na pH (PROSSER et al. 1989). Pro každou bílkovinu existuje podle specifity náboje hodnota pH, tzv. izoelektrický bod, ve kterém jejich náboj zaniká (VODRÁŽKA 1982). Vzhledem k tomu mohou bílkoviny existovat minimálně ve třech nábojových formách, přičemž v izoelektrickém bodě ztrácejí schopnost migrace v elektrickém poli (BÁRTA 1997).

Pro účinné elektroforetické dělení je významná volba takového pH, při kterém budou mít dělené složky největší rozdíl v pohyblivosti. Je třeba potlačit difuzi a konvekce, které vedou k proudění prostředí a k rozmazávání dělených zón. Tyto vlivy byly odstraněny zavedením nosných médií (nosičů), zvláště gelových, jejichž strukturu si můžeme představit jako molekulární síto otevřených pórů obsahujících elektrolyt. Jsou – li póry veliké v poměru k velikosti molekul (agarový gel), bude probíhat dělení pouze na základě náboje. Jestliže však póry mají průměry srovnatelné s velikostí separovaných molekul, dochází k dělení i podle jejich molekulární hmotnosti a tvaru (ČERNÝ & ŠAŠEK 1998).

Tab. III: Přehled nejčastějších aplikací jednotlivých elektroforetických technik

Aplikace	PAGE HB	PAGE MPB	SDS-PAGE	PGGE	2D-PAGE	IEF	Acetyl Cel.	SGE
analýza neznámé směsi	•	•	•	•	•	•		•
porovnání známého a	•	•	•	•		•		

neznámého vzorku								
membránové bílkoviny	•	•	•	•				
testování čistoty (homogenity) vzorku	•	•	•	•				
určení molekulové hmotnosti	•		•	•				
izoenzymová analýza	•	•		•			•	•

Převzato z BARTA 2002

Pozn. **PAGE HB** - polyakrylamidová elektroforéza v homogenním pufrovém systému
PAGE MPB - polyakrylamidová elektroforéza v multifázovém pufrovém systému
SDS-PAGE - polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti detergentu SDS
PGGE - polyakrylamidová koncentrační gradientová elektroforéza
2D-PAGE - dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza
IEF - isoelektrická fokusace
Acetyl. Cel. - elektroforéza na acetylcelulóze
SGE - škrobová elektroforéza

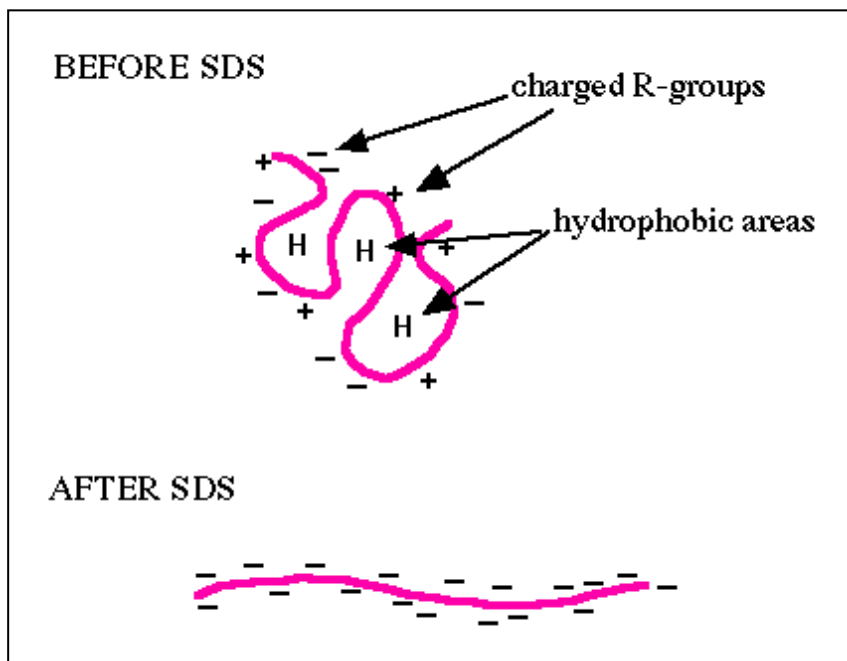
Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (dále jen PAGE) je nejčastěji používanou metodou k analytickému stanovení složitých směsí příbuzných proteinů. Bílkovinné molekuly jsou při ní separovány podle svého elektrického náboje a molekulové hmotnosti (VODRÁŽKA 1982).

PAGE má oproti jiným technikám elektroforézy řadu výhod, ale i nežádoucích vlastností. Jejím hlavním úskalím je toxicita monomerů. Při dodržení základních hygienických podmínek lze však riziko při manipulaci s akrylamidem minimalizovat a výhody PAGE převládají: Jedná se především o pružnost a termostabilitu gelů, dále o možnost jejich vysušení a získání dlouhodobého záznamu. Přesné regulace velikosti a množství pórů se dá dosáhnout změnou množství monomerů AC + BIS či jejich vzájemného poměru (ANONYM 5. 1994). To tedy znamená, že při konvenční PAGE se látky dělí v homogenním gelu nejen podle náboje, ale i podle velikosti molekul.

Pokud chceme porovnávat molekuly výlučně jen podle jejich velikosti, můžeme použít elektroforézu na polyakrylamidovém gelu s přidavkem natrium dodecylsulfátu (SDS) k dělené směsi. SDS je aniontový detergent, který se pevně váže na proteinové molekuly, a to v tak velké míře, že jim vnesené negativní náboje zcela zastíní původní náboj bílkovinné molekuly (VODRÁŽKA 1982). Interakce s SDS dále naruší všechny nekovalentní vazby, což vede k denaturaci (viz Obr. II) proteinů (ANONYM 2. 2006). Elektroforetická mobilita vzniklého komplexu detergent – polypeptid je pak funkcí jejich molekulové hmotnosti (GARFIN 1990).

Obr. II: Molekula proteinu před a po denaturaci SDS



Převzato z ANONYM 2. 2006

3.2.5. Zvýšení koncentrace proteinů

3.2.5.1. Lyofilizace

Lyofilizace je nejšetrnějším způsobem vysoušení a tím konzervace biologicky aktivních látek. Kromě toho slouží též pro zvýšení koncentrace zkoumaného vzorku. Jedná se o techniku s vysokou kapacitou a poměrně snadnou proveditelností.

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

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

3.2.5.2. Ultrafiltrace

Principem ultrafiltrace neboli membránové filtrace je oddělování koloidně disperzního podílu od disperzního prostředí i od nízkomolekulárních látek, současně přítomných ve formě pravého roztoku filtrací polopropustnými membránami, kterými neprocházejí koloidní částice (velikost pórů 1 nm až 0,1 μm) (ANONYM 3. 2006). Při použití různých membrán o známých propustnostech je možno rozdělit polydisperzní systém na frakce podle velikosti částic; zakoncentrování proteinů i odstranění nízkomolekulárních látek, např. solí (ANONYM 2. 2006).

3.3. FYTOPATOGENNÍ HOUBY

3.3.1. Obecná charakteristika

Houby jsou jednobuněčné nebo vícebuněčné eukaryotní organismy. Stélka většiny hub sestává z podélných vláken (hyf), s jasně diferencovanými buněčnými stěnami. Soubor hyf vytváří mnohjaderný vegetativní útvar – podhoubí neboli mycelium.

Buněčná stěna hub sestává ze dvou i více vrstev a tvoří ji mikrofibrily zakotvené v amorfním materiálu. Její hlavní chemickou složkou jsou polysacharidy. Nejdůležitější z nich: chitin, celulóza a nerozpustné glukany, se mohou vyskytovat ve formě mikrofibril a tvoří tak základ strukturální pevnosti buněčných stěn. Ostatní komponenty - sacharidy, proteiny, lipidy a minerální látky jsou většinou amorfní (KÚDELA et al. 1989). Přestože je především chytin uváděn jako dominantní složka buněčných stěn hub, existují skupiny, kde byl zjištěn pouze ve stopách nebo chybí úplně. V takových případech bývá nahrazen mananem, polymery galaktózy a galaktosaminu či celulózou (VÁŇA 1998).

Rozmnožování hub probíhá výtrusy, vzniklými nepohlavně či pohlavní kopulací. V průběhu životních cyklů se střídá haploidní fáze s diploidní (KÚDELA et al. 1989).

Nepřítomnost chlorofylu a vodivých pletiv určuje heterotrofní (saprofytický nebo parazitický) způsob výživy (VÁŇA 1998). Při saprofytickém způsobu výživy využívají houby ke stavbě svého těla organické látky z odumřelých těl a orgánů rostlin a živočichů, různých organických odpadků a vody bohaté organickými látkami. Naproti tomu pro parazitický způsob výživy je charakteristická částečná nebo úplná nutriční závislost na živém organismu, která již vyžaduje určitý stupeň přizpůsobení parazita obranným reakcím hostitele. I přes tuto skutečnost převládají parazitické houby nad saprofytickými. Důvodem je především to, že parazitický

organismus se ve značné míře vyhýbá konkurenci o nedostávající se výživné látky, kterou musí nést mnozí saprotrofové. Mezi parazitismem a patogenismem (tzn. schopností vyvolávat chorobu) existuje velmi těsný vztah. Parazitický vztah však nemusí vždy vyvolávat stav patologický (KÚDELA et al. 1989).

3.3.2. Význam fytopatogenních hub

Fytopatogenní houby mají ze všech původců rostlinných chorob největší význam. Ve střeoevropských podmínkách je jimi vyvoláno asi 84 % všech ekonomicky závažných chorob rostlin (KÚDELA et al. 1989). Podíl škod jimi působených se odhaduje na 60 % všech ztrát vyvolaných na rostlinách původci chorob (ČAČA et al. 1981; KAVKOVÁ, ústní sdělení 2004). Důvodem takto vysoké úspěšnosti hub při napadení rostlin je především skutečnost, že disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů (PROCHÁZKA et al. 1998). Zatímco k infekci rostliny bakterií nebo virem je nutné nějaké poranění nebo alespoň přirozený otvor (např. průduch, lenticela, hydatoda, listová jizva či trichom, jimiž dochází k tzv. pasivní penetraci), proniká řada hub pomocí svých exoenzymů do rostlin aktivně.

Schopnost aktivní penetrace je zcela výhradně vlastností některých fytopatogenních hub. Při aktivní penetraci do hostitelských pletiv musí houba překonávat přirozené ochranné bariéry. Aktivní penetrace může probíhat přes kutikulu nebo přímo přes buněčnou stěnu, přičemž při pronikání kutikulou mají rozhodující význam enzymy degradující kutin (kutinázy), při pronikání buněčnou stěnou celulólytické enzymy (KÚDELA et al. 1989).

3.3.3. Nejvýznamnější původci houbových chorob brambor

Druh *Solanum tuberosum* L., (Brambor hlíznatý) je rostlinou s dobře vyvinutou nadzemní hmotou i podzemními orgány. Oproti svým fylogenetickým předkům, kteří jsou diploidní, má *S. tuberosum* již 4 sady chromozómů (JÚZL et al. 2000). Postrádá však vysoká množství antinutričních látek, které u planých druhů znemožňují jejich konzumaci nejen člověku, ale i radě škůdců a patogenů. Většina těchto látek je přítomná i u druhu *S. tuberosum*, ale v mnohonásobně nižších koncentracích. Proto se jim řada původců chorob poměrně rychle přizpůsobila a *S. tuberosum* se tak pro ně stal vhodným trofickým prostředím.

Nejvýznamnějšími původci houbových chorob brambor, kteří za vhodných podmínek pro svůj rozvoj mohou výrazněji snížit výnos nebo poškodit kvalitu hlíz jsou *Phytophthora infestans* (původce plísně bramborové), *Rhizoctonia solani* (původce vložkovitosti hlíz), dále houby z rodů *Fusarium* a *Phoma* (původci skládkových hnilob hlíz), *Alternaria solani*

(původce hnědé skvrnitosti listů) a *Synchytrium endobioticum*, původce rakoviny brambor (KAZDA et al. 2001).

3.4. INTERAKCE OBRANNÝCH SYSTÉMŮ ROSTLINY S PATOGENNÍM POTENCIÁLEM HUB

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořily v průběhu jejich koevoluce komplikované vzájemné vztahy. U patogenů se vyvinuly systémy umožňující jim parazitismus a patogenismus, rostliny získaly pozoruhodný obranný potenciál (KŮDELA et al. 1989).

Obrana rostlin vůči útokům patogenních agens se odehrává ve dvou základních rovinách - fyzikální a chemické. Obrana rostlin prostřednictvím fyzikálních bariér jako je buněčná stěna, kutikula, vosky a krycí pletiva je známa již delší dobu. Tyto struktury však nepředstavují především pro specializované patogeny nepřekonatelnou překážku (HEŘMANOVÁ et al. 2006). Stále aktuálnější se proto stává výzkum obranných reakcí rostlin na chemické bázi, především schopnost produkce sloučenin s antimikrobiálním působením. Tyto sloučeniny jsou nejčastěji představovány různými peptidy, proteiny a enzymy.

Biochemické studie obranných reakcí brambor na napadení odkryly řadu základních, ale i indukovaných enzymů, které se podílejí na ochraně rostliny před patogenními agens (SHARMA et al. 2004). Základní enzymy jsou přítomné v rostlině stále a jejich koncentrace se příliš nemění. Naopak koncentrace indukovaných enzymů obvykle prudce narůstá po poranění nebo napadení rostliny patogenem. Příkladem mohou být chitinázy a glukánázy, které se akumulují v infikovaných pletivech a podílejí se na degradaci buněčných stěn hub a bakterií (TONÓN et al. 2002).

3.4.1. Stresové proteiny

Pod vlivem stresového působení na rostlinu dochází často již během několika desítek minut ke změnám v kvantitativním a kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých se zastavuje, u jiných naopak stoupá. Mnohonásobné zvýšení syntézy v důsledku působení stresoru nastává především u stresových proteinů, patřících k pravidelné výbavě buněk všech genotypů.

Jedná se o několik desítek proteinů, rozmanitého tvaru i funkce, o relativní molekulové hmotnosti mezi 8000 a 260000. Většina z těchto proteinů je indukována nespecificky, tedy různými typy stresorů. Jejich intenzivní tvorba souvisí se vzrůstem počtu poškozených proteinů

v různých buněčných strukturách, neboť hrají roli při zvýšení odolnosti rostliny a nápravě poškozených částí buněk.

Stresové proteiny je možné dělit podle faktoru vyvolávajícího jejich tvorbu: Proteiny indukované zvýšenou teplotou, chladem, dehydratací, sníženou koncentrací kyslíku a patogeny (PROCHÁZKA et al. 1998).

3.4.2. Mechanismus obranné reakce

Obranná reakce rostliny je vyvolána kontaktem nebo průnikem patogenního organismu do buňky (SHARMA et al. 2004). Od tohoto okamžiku se v rostlině spouští řada koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat působení a šíření patogena do dalších buněk (PROCHÁZKA et al. 1998). Rozpoznání patogena rostlinou a naopak – rostliny patogenem se odehrává na molekulární úrovni (SHARMA et al. 2004), prostřednictvím tzv. elicitoru. Elicitem bývá specifický metabolit identifikovatelný receptorem hostitelské rostliny (HEŘMANOVÁ et al. 2006).

Průběh a výsledek interakcí mezi hostitelem a patogenem závisí primárně na jejich genetickém vybavení (KÚDELA et al. 1989). Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. Přenos od aktivovaných receptorů k DNA je možný více systémy. Jedná se především o fosfoinositidový systém, při kterém jsou hydrolýzou lipidů plazmatické membrány rostlinné buňky generovány dvě signální sloučeniny (inositol-1,4,5-trisfosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinasy a posléze i expresi genů. Následná obranná reakce zahrnuje tvorbu nekrotů (hypersenzitivní reakce), syntézu sloučenin s antibiotickým účinkem (fytoncidů) a syntézu specifických stresových proteinů.

Hypersenzitivní reakce patří mezi nejúčinnější obranné mechanismy. V napadené buňce během krátké doby naroste koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku, což vede k rychlé zkáze napadené buňky. Hypersenzitivní reakce je pro okolní buňky často spouštěcím mechanismem pro syntézu fytoncidů (flavonoidů, terpenoidů, fenolických látek a alkaloidů) a stresových PR proteinů (zkratka pochází z anglického označení *pathogenesis-related proteins*), neboli proteinů souvisejících s patogenezí (HEŘMANOVÁ et al. 2006).

3.4.3. Proteiny související s patogenezí

PR proteiny tvoří mimořádně početnou a různorodou skupinu stresových proteinů, jejichž syntéza je indukovaná přítomností specifického infekčního organismu (PROCHÁZKA et al. 1998).

V případě, kdy je rostlina napadena houbou, dochází k tvorbě tzv. antifungálních proteinů, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. Výskyt těchto proteinů však není omezen pouze na rostliny, obdobné proteiny byly nalezeny i u hmyzu a mikroorganismů. U vyšších organismů jsou antifungální proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného systému – vrozené imunity (THEIS & STAHL 2004).

Do současnosti bylo izolováno několik set těchto proteinů a lze říci, že nové jsou objevovány téměř denně (SELITRENNIKOFF 2001). Jejich různorodost a fakt, že jsou stále objevovány nové, ztěžuje jejich klasifikaci. Většina autorů (TERRAS 1994, SELITRENNIKOFF 2001, THEIS & STAHL 2004) se však shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám PR proteinů (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného izoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco basické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách.

Z doposud známých skupin antifungálních proteinů byl mechanismus účinku zcela popsán pouze u skupiny PR-2 a PR-3 proteinů, které narušují základní stavební struktury buněčných stěn hub. PR-2 proteiny (β -glukanasy) hydrolyzují strukturu β -glukanů, PR-3 (chitinasy) narušují chitinové polymery buněčné stěny (SELITRENNIKOFF 2001).

3.4.3.1. PR-1 proteiny

PR-1 proteiny vykazují podobnost vůči skupině proteinů bohatých na cystein. Jedná se o významnou skupinu PR proteinů, které se často využívají jako markery pro studium indukované resistance rostlin. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15-17 kDa (SELITRENNIKOFF 2001). PR-1 proteiny byly poprvé izolovány z tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), později byly nalezeny u mnoha dalších rostlin (např. *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Arabidopsis thaliana* L.). Antifungální aktivita byla u těchto proteinů prokázána proti řadě houbových patogenů – *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora parasitica* a *Peronospora tabaci*. Stabilní struktura většiny PR-1 proteinů, odolná proteasové degradaci, je zajištěna přítomností šesti cysteinových zbytků, které zajišťují tvorbu

sulfidických můstků. Mechanismus účinku PR-1 proteinů není znám (HEŘMANOVÁ et al. 2006).

3.4.3.2. PR-2 proteiny (β -glukanázy)

Společným znakem proteinů této skupiny je β -(1,3)-endoglukanázová aktivita. Vzhledem k enzymové aktivitě PR-2, spočívá jejich mechanismus účinku v hydrolyze struktury (1,3) β -glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupné oslabování buněčných stěn vede následně k lyzi buněk. V primární struktuře β -glukanáz 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).

Na základě analýzy aminokyselinové sekvence jsou PR-2 proteiny děleny do tří skupin. První skupina představuje bazické, intracelulární proteiny s velikostí přibližně 33 kDa, druhá a třetí skupina zahrnuje kyselé extracelulární proteiny o velikosti 36 kDa. Bazické PR-2 proteiny jsou produkovány ve formě prekursorů, jejichž enzymatická aktivita je dána posttranslačními úpravami. Bazické izoformy vykazují 50 až 250 krát vyšší aktivitu než kyselé izoformy PR-2 proteinů. Antifungální aktivita byla zjištěna proti celé řadě organismů – např. *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus* (SELITRENNIKOFF 2001). PR-2 proteiny byly nalezeny u řady rostlin. Například u rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byla zjištěna β -(1,3)-glukanázová aktivita u zásobního proteinu hlíz, patatinu (TONON et al. 2001). Následně byla dokázána antifungální aktivita tohoto proteinu vůči patogenu *Phytophthora infestans* (TONON et al. 2002).

3.4.3.3. PR-3 proteiny (chitinasy)

Jedná se o skupinu PR proteinů, které vykazují endochitinázovou aktivitu. Tato aktivita je u bazických chitináz pětikrát vyšší než u kyselých. Hmotnost většiny PR-3 proteinů se pohybuje v rozmezí 26-43 kDa. Tyto proteiny byly izolovány z celé řady rostlin - tabáku, okurky, fazolu, hrachu, obilovin, ale i z mnoha dalších. Antifungální aktivitu vykazují proti řadě houbových organismů - *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*. Mechanismus účinku PR-3 proteinů je dán jejich enzymovou aktivitou. Jedná se o endochitinázy, které narušují chitin přítomný v buněčné stěně hub. Antifungální aktivita rostlinných endochitináz je *in vitro* synergisticky zvyšována přítomností PR-2 proteinů (HEŘMANOVÁ et al. 2006).

3.4.3.4. PR-4 proteiny (proteiny vážící se na chitin)

Jedná se o významnou skupinu PR proteinů majících schopnost vazby na chitin buněčných stěn hub. Molekulová hmotnost je od 3,1 do 20 kDa (THEIS & STAHL 2004). PR-4 proteiny vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a degradaci proteázami. (HEŘMANOVÁ et al. 2006). Skupina PR-4 proteinů je na základě struktury klasifikována do dvou tříd (THEIS & STAHL 2004). PR-4 proteiny třídy I mají N-terminální na chitin se vážící doménu, která je podobná doméně přítomné u heveinu. Z tohoto důvodu se tato třída řadí do nadtřídy na chitin se vážících lektinů. Do této skupiny patří např. proteiny Win 1 a Win 2, které byly izolované z brambor (*Solanum tuberosum* L.). PR-4 proteiny třídy II na chitin se vážící doménu neobsahují. PR-4 proteiny byly opět izolovány z celé řady rostlin. Spektrum houbových organismů, vůči kterým vykazují antifugální aktivitu je velmi široké – např. *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea* (SELITRENNIKOFF 2001). Mechanismus účinku PR-4 proteinů není zcela objasněn. PR-4 proteiny třídy I mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny, a tím narušovat polaritu a růst buněk. Mechanismus účinku PR-4 proteinů třídy II, které postrádají vazebnou doménu, je nejasný (HEŘMANOVÁ et al. 2006).

3.4.3.5. PR-5 proteiny (proteiny podobné thaumatinu)

Molekulová hmotnost těchto proteinů je 24-25 kDa (SELITRENNIKOFF 2001). PR-5 proteiny byly nalezeny u celé řady rostlin – např. *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L., ale i mnoha dalších. Přítomnost 16 cysteinových zbytků, které tvoří 8 disulfidických můstků, poskytuje PR-5 proteinům vysokou stabilitu vůči změnám teploty, pH a degradaci proteázami. Mechanismus účinku těchto antifungálních proteinů není doposud znám. PR-5 proteiny jsou účinné proti širokému spektru houbových patogenů (HEŘMANOVÁ et al. 2006). Nejznámějším PR-5 proteinem je zeamatin (*Zea mays*), o jehož využití se vážně uvažuje i v lékařství, a to z důvodu jeho účinnosti proti kvasinkám *Candida albicans* a *C. vaginitis* (STEVENS et al. 2002).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. Rostlinný materiál

Pro všechny analýzy v rámci maloparcelkového odrůdového experimentu byly použity vyzrálé bramborové hlízy odrůd, které jsou blíže charakterizovány v Tab. IV. Brambory byly vypěstované v roce 2004 na školním pozemku Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích, který se nachází v nadmořské výšce 383 m. n. m. ve vrchovinaté oblasti bramborářského výrobního typu s průměrnou roční teplotou 7,8 °C a průměrným ročním úhrnem srážek 620 mm.

Tab. IV: Charakterizace odrůd použitých v pokusech

Odrůda	Kód pro antifungální testy	Ranost	Pěstitelský směr	Odolnost odrůdy vůči škodlivým organismům
Karin	K ₁₂	raná	konzumní	Resistance: rakovina biotyp 1 Odolnost: virové choroby a aktinomycetová strupovitost Náchylnost: háďátkem bramborovým biotopu Ro 1
Tomensa	P ₁₇	raná	průmyslová	Resistance: háďátko bramborové biotopu Ro 1 Odolnost: virové choroby Náchylnost: rakovina brambor biotopu 1
Bionta	K ₄	pozdní	konzumní	Resistance: háďátko bramborové biotopu Ro 1 Odolnost: virové choroby a plíseň bramborová na nati Silná náchylnost: rakovina brambor biotopu 1
Merkur	P ₈	velmi pozdní	průmyslová	Resistance: háďátko bramborové biotopu Ro 1 Odolnost: plíseň bramborová na nati Náchylnost: rakovina brambor biotopu 1
Symfonia	K ₂₀	pozdní	konzumní	Resistance: háďátko bramborové biotopu Ro 1 Střední náchylnost: rakovina brambor biotopu 1
Westamyl	P ₂₀	pozdní	průmyslová	Resistance: háďátko bramborové biotopu Ro 1 a rakovina brambor biotopu 1

Modifikováno podle ANONYM 4. 2004

4.1.2. Houbové organismy

Houbové organismy (pro druh *Solanum tuberosum* L. patogenní i nepatogenní) použité v antifungálních testech jsou uvedeny v Tab. V.

Tab. V: Charakterizace hub použitých v pokusech

Druh	Označení kmene	Zdroj
<i>Rhizoctonia solani</i>	kmen F-1	Česká sbírka mikroorganismů, Brno (CCM)
<i>Alternaria solani</i>	kmen F-167	Česká sbírka mikroorganismů, Brno (CCM)
<i>Fusarium solani</i>	kmen 8079	Česká sbírka mikroorganismů, Brno (CCM)
<i>Fusarium solani</i>	kmen 1036	RNDr. Alena Nováková, PB AVČR
<i>Trichoderma viride</i>	kmen F-728	Česká sbírka mikroorganismů, Brno (CCM)

4.2. METODIKA

4.2.1. Příprava bramborové šťávy

Bramborová šťáva tvořila výchozí materiál pro izolaci celkového proteinu a purifikaci patatinu. Od každé z výše uvedených odrůd (Tab. IV) bylo důkladně omyto a nakrájeno na menší kousky 10 hlíz. Šťáva z brambor byla získána na domácím odšťavovači (AEG). Během získávání šťávy byl přidán antioxidant, 2% (w/v) roztok NaHSO₃ v množství 50 ml na 1 kg brambor, pro zmírnění enzymatického hnědnutí. Získaná šťáva byla následně v 50 ml tubách zmrazena při -80°C. Po rozmražení byla bramborová šťáva centrifugována (15 min; 3600g; 4°C) a tekutý podíl byl přefiltrován papírovým filtrem KA 1 (rychlá filtrace), Fisher.

4.2.2. Izolace celkového proteinu

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; 3600 g) 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 a po lyofilizaci byla zjištěna hmotnost sušiny. Tyto proteinové izoláty byly použity pro testování antifungální aktivity celkového hlízového proteinu.

4.2.3. Purifikace proteinů patatinového komplexu

Patatin byl izolován na základě modifikované metodiky z práce POTS, 1999 (BÁRTA, nepubl.). Byl použit dvoustupňový systém purifikace patatinu využívající v prvním kroku iontovýměnnou a v druhém afinitní chromatografii. Iontovýmienná chromatografie probíhala na 50 ml gravitační koloně s chromatografickou náplní DEAE 52 – Cellulose Servacel (SERVA), afinitní chromatografie na 30 ml gravitační koloně Con A Sepharose 4 B (Amersham).

4.2.3.1. Iontovýmienná chromatografie, DEAE (diethylaminoethyl)

Hodnota pH bramborové šťávy byla před nanesením na kolonu upravena pomocí 1M Tris na pH 7,4. Před nanesením vzorku proběhla kalibrace kolony pomocí 250 ml startovacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4). Na kolonu bylo následně naneseno 50 ml upraveného vzorku a kolona byla promývána pomocí 250 ml startovacího pufru. Promývací krok slouží k odstranění nenavázaných složek bramborové šťávy. K isokratické eluci navázaných složek bylo použito 50 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl). Regenerace kolony, jejímž účelem bylo odstranění zbytkových, navázaných látek byla provedena pomocí 100 ml regeneračního pufru (2 M NaOH) a poté následovala opět ekvilibrace kolony pomocí startovacího pufru a následné nanesení nového vzorku. Ze získaného eluátu bylo odebráno 500 μ l pro determinaci bílkovinných spekter pomocí SDS-PAGE v rámci kontroly úspěšnosti prvního kroku purifikačního procesu.

4.2.3.2. Afinitní chromatografie, Con -A (Concanavalin -A)

Hodnota pH eluátu, který byl získán v předcházejícím purifikačním kroku, byla upravena pomocí 1M HCl na hodnotu pH 7,4. Kolona s afinitní náplní byla před nanesením 50 ml tohoto vzorku ekvilibrována pomocí 300 ml startovacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl). Po nanesení vzorku byla kolona promyta 200 ml startovacího pufru. Po promytí náplně kolony následovala dvoustupňová eluce navázaného patatinu – 2x 30 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl + 100mM α -D-methyl glukopyranosid). Získaný eluát byl zamražen a uchováván při -80°C. Po eluci byla náplň kolony ekvilibrována střídavou aplikací (3x) 70 ml kyselého (50 mM Na-acetát, pH 4,5 + 0,5 M NaCl) a 70 ml bazického pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 0,5 M NaCl).

Z eluátu, který byl získán v tomto purifikačním kroku, bylo odebráno 500 μ l pro determinaci bílkovinných spekter pomocí SDS-PAGE v rámci kontroly úspěšnosti druhého kroku purifikačního procesu.

4.2.4. Úprava získaného proteinu - odsolování a sterilizace

Purifikovaný roztok patatinu (30 ml) byl odsolen (nutné z důvodu vysokého obsahu NaCl a α -D-methyl glukopyranosidu v elučním pufru) pomocí 100 ml gravitační kolony s náplní SEPHADEX^(tm) G – 25 (princip gelové filtrace) následujícím způsobem. Kolona byla ekvilibrována 300 ml pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) a poté byl na kolonu nanesen vzorek o celkovém objemu 30 ml. Po úplné absorpci vzorku médiem, byl odsolený patatin vymýván 40 ml elučního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Pro úplné odsolení vzorku byl proces odsolování pomocí gelové filtrace opakován.

Před vlastním použitím v antifungálních testech byl roztok celkového proteinu i patatinu sterilizován pomocí bakteriálních millipore filtrů (velikost pórů 0,22 μ m).

4.2.5. Charakterizace hlízových proteinů pomocí elektroforetických technik

4.2.5.1. SDS-PAGE

Technika SDS-PAGE byla použita pro determinaci proteinových spekter celkového proteinu hlíz, rozpustných hlízových proteinů šťávy použitých pro následnou purifikaci patatinu, dále byla tato metodika použita pro kontrolu purifikace patatinu – sledování změny proteinových spekter získaných eluátů v jednotlivých krocích purifikace a zhodnocení úspěšnosti purifikačního procesu z hlediska čistoty získaného proteinu. Technika SDS-PAGE byla dále použita pro charakterizaci molekulární hmotnosti (HM) purifikovaného patatinu, hodnocení procentického zastoupení sledovaných frakcí proteinů v celkovém proteinu hlíz brambor a hodnocení frakčního složení bramborové šťávy která sloužila jako výchozí materiál pro purifikaci.

Extrakce a SDS-PAGE hlízových proteinů bramborové šťávy

Bramborová šťáva připravená výše uvedeným způsobem, která byla následně použita pro purifikaci patatinových bílkovin, byla determinována z hlediska přítomnosti cílových patatinových bílkovin. Z důvodu očekávané vysoké koncentrace proteinů byla šťáva naředěna dH₂O v poměru 1:1. Ke 100 μ l této šťávy bylo přidáno 25 μ l 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 přidalo 340 μ l 2-merkptoethanolu). Před nanesením na gel v množství 15 μ l byl vzorek vařen ve vodní lázni.

SDS-PAGE

Použita byla diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) – 4% zaostřovací gel (0,125 M Tris-HCl, pH 6.8 + SDS) a 10% separační gel (0,375 M Tris-HCl, pH 8.8 + SDS) – v prostředí systému 0,025 M Tris + 0,192 M glycine (pH 8.3) + SDS. Podrobné složení gelových systémů a elektrodového pufru je uvedeno v Tab. VI. Separace probíhala při proudu 40 mA na gel, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4 hod.

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

Detekce proteinů byla provedena barvením roztokem Coomasie Brilliant Blue přes noc (barvicí směs – methanol, ledová kys. octová, voda v poměru 5:1: 4 + 0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Po detekci bylo odbarveno nespecifické pozadí (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 (BÁRTA 2002). Před vlastním softwarovým stanovením procentického zastoupení patatinových proteinů byly gely digitalizovány prostřednictvím scanneru do podoby TIFF formátu. Kvantifikace proteinů patitového komplexu byla provedena pomocí softwaru BioProfil.

4.2.5.2. Native-PAGE

Jedná se o elektroforetickou metodu pomocí které lze charakterizovat nativní (nedenaturovaná) spektra hlízových proteinů res. purifikovaného patatinu. Při použití nativní elektroforézy dochází k rozdělení proteinových frakcí na základě jejich náboje – hodnotí se elektroforetická mobilita jednotlivých zón či pruhů. Nativní PAGE byla také použita k detekci esterázové aktivity patatinových proteinů na gelu – detekci a hodnocení izoenzymů esteráz.

PAGE

K 100 µl vzorku (roztok purifikovaného patatinu) bylo přidáno 25 µl nanášecího pufru (40% glycerol, 10 mg BPB/100 ml pufru). Vzorky byly na gel nanášeny v množství 20 µl. Dělení proteinových frakcí probíhalo v prostředí Tris-borátového pufru, pH 8.3. Použit byl kontinuální gelový systém – 7.5 % (pH 7.2). Podrobné složení gelů je uvedeno v Tab. VII. Separace probíhala při 25mA na gel, 150-200 V, při teplotě 4°C, po dobu 2-3 hodin (BÁRTA 2002). Analýza byla provedena na přístroji SE 600, Hoefer, USA.

Detekce nedenaturovaných proteinů

Detekce nedenaturovaných proteinů a následná úprava gelů byla provedena stejným způsobem jako v případě SDS-bílkovin.

Tab. VI: Složení roztoků pro SDS – PAGE (denaturační systém)

Komponenta	Jednotka	Separační gel 10 %	Zaostřovací gel 3,75 %
Redestilovaná voda	ml	42	12,15
AC / BIS	ml	26,6	2,5
Pufř A	ml	10	-
Pufř B	ml	-	5
SDS	μl	800	200
Siřičitan sodný	μl	60	20
Persíran amonný	μl	400	150
TEMED	μl	40	20

Převzato z BARTA 2005 (nepubl.)

Poznámky:

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

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

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

Siřičitan sodný: nasycený vodný roztok

Persíran amonný: 15% roztok

SDS: 10% roztok

Elektroodový pufř 1: 14,4 g glycinu, 3 g Tris, pH 8,3/1000 ml (esterázy, nativní proteiny)

Elektroodový pufř 2: 144 g glycinu, 3 g Tris, 10 g SDS, pH 8,3/1000 ml (SDS-PAGE)

Tab. VII: Složení roztoků pro diskontinuální PAGE (nedenaturační systém)

Komponenta	Jednotka	Separační gel 7,5 %	Zaostřovací gel 3,75 %
Redestilovaná voda	ml	50	12,5
AC / BIS	ml	20	2,5
Pufř A	ml	10	-
Pufř B	ml	-	5
Siřičitan sodný	μl	60	20
Persíran amonný	μl	400	150
TEMED	μl	40	20

Převzato z BARTA 2005 (nepubl.)

Detekce izoenzymů esteráz na gelu

Esterázová aktivita byla vizualizována inkubací gelů za tmy ve 100 ml 0,1 M Tris-glycinového pufru, pH 7.2 obsahujícího 40 mg α -naftyl acetátu, 40 mg β -naftyl acetátu a 100 mg Fast Blue RR salt (BÁRTA 2002). Po detekci esterázové aktivity byly gely fixovány a sušeny stejným postupem jako v předcházející kapitole.

4.2.5.3. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace porufikovaného patatinu byla provedena pomocí jednotky pro IEF (Model 111 Mini IEF Cell) od firmy Bio-Rad (USA). Gel byl připraven na speciální folii podle instrukcí dodavatele, vzorky odsoleného patatinu byly nanесeny na gel v množství 1 μ l, detekce proběhla podle instrukcí dodavatele inkubací gelu v roztoku (27 % etanol, 10 % kyselina octová, 0.04 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 0.5 % CuSO_4 – rozpustit a doplnit dH_2O do 1 litru).

4.2.5.4. Zpracování elektroforetických dat

Po detekci a sušení byly gely digitalizovány prostřednictvím stolního scanneru při 400 dpi do podoby TIFF formátu. Ten byl použit jako výchozí pro vlastní zpracování elektroforetických dat pomocí software BioProfil 1D++ (Vilber Lourmat) – stanovení relativního zastoupení proteinových frakcí, určení molekulové hmotnosti, izoelektrického bodu a relativní mobility, stanovení koeficientů podobnosti a konstrukce dendrogramů.

4.2.6. Antifungální testy - hodnocení inhibičního vlivu proteinu

Na modelové systémy fytopatogenních hub byl hodnocen vliv celkového proteinu a patatinu z bramborových hlíz zvolených odrůd. Kromě vlastních antifungálních vlivů spadají do této části další metodické postupy:

4.2.6.1. Inokulace a kultivace houbových organismů

Každá z výše uvedených hub byla kultivována na bramboro-dextrosovém agar (Potato-Dextrose-Agar, dále PDA). Kultivační médium bylo připraveno ze standardního polotovaru firmy Difco (39 g na 1000 ml destilované vody). Vysterilizované médium bylo rozlito do sterilních plastických Petriho misek (1000 x 15 mm). Po vychladnutí živného média se houba inokulovala na jeho povrch. Inokulace byla provedena podle potřeby pomocí separačních čar nebo středových kultur a pomocí agarového terčičku nebo konidiové suspenze (10 μ l; 1×10^7).

Po inokulaci byly Petriho misky vloženy na dobu 5-7 dní do termostatu, který byl vytemperován na teplotu cca 25°C.

4.2.6.2. Příprava konidiové suspenze

Na povrch sporulující kultury příslušné houby (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*) byl přilít sterilní roztok 0,05 % Tween 80. Získaná suspenze byla přemístěna do sterilní skleněné zkumavky a homogenizována. Tímto způsobem se získala tzv. originální suspenze. Vzhledem k předpokládané vysoké koncentraci konidií v 1ml byla tato suspenze naředěna v poměru 1:10. V naředěné suspenzi se pomocí počítací komůrky – hemacytometru (zdokonaleném Neubauerem) zjistila skutečná koncentrace konidií na 1ml. Získaná suspenze byla použita k pokusům, které jsou uvedeny níže.

4.2.6.3. Metody stanovení antifungální aktivity proteinu

Paper discs diffusion assay - difuze proteinu agarem

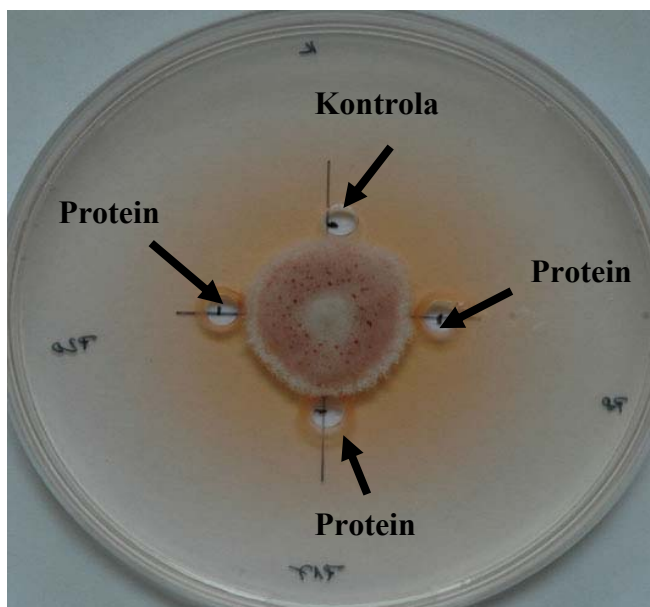
Jedná se modifikaci metody uváděné v práci SCHLUMBAUM et al. (1986) a HUYNTH et al. (1996). Metoda je standardně používána pro primární ověření antifungální aktivity proteinu. Principem je postupná difuze aplikovaného proteinu k okrajové části mycelia kultivované houby. Na okrajích mycelia se sleduje vliv testovaného proteinu – zejména se jedná o vytváření inhibičních zón v okolí papírového terčíku, na který byl aplikován protein. Jako doplňkovou charakteristiku lze sledovat i makroskopické změny ve struktuře a utváření mycelia, které mohou být vyvolány především enzymatickou aktivitou testovaného proteinu.

Mycelium příslušné houby bylo odebráno ze 14 denní kultury (7 denní kultury u rychle rostoucích kultur – např. *Rhizoctonia solani*). Druhy se sterilním myceliem byly inokulovány ve formě agarových terčků o průměru 0,6 mm do středu Petriho misky. Druhy s fertilním myceliem byly do Petriho misek inokulovány kličkou ve formě konidiové suspenze (10 µl; 1×10^4).

V závislosti na rychlosti růstu jednotlivých druhů hub byly po 3 – 7 dnech od jejich inokulace na agary vloženy sterilní testovací terčíky (4mm; Whatmann no. 4) z filtračního papíru. Do každé misky bylo vloženo po 4 sterilních papírových terčících o průměru 0,6 mm, vždy do vzdálenosti 0,5 cm od okraje mycelia houby - viz Obr. III. Na tři terčíky bylo aplikováno 20 µl proteinového roztoku (patatinu); 50 µl při testování inhibiční aktivity celkového hlízového proteinu. Kontrola (čtvrtý terčík na agaru) představovala 20 µl (res. 50 µl) pufru ve kterém byl protein rozpuštěn. Inkubace probíhala při teplotě cca 25°C. Inhibiční zóny a změny v utváření mycelia byly sledovány v časových intervalech 12, 24, 48, 60 a 72 hodin.

Byla hodnocena přítomnost inhibičních zón a zaznamenány byly veškeré změny, které nastaly v utváření mycelia. V průběhu sledování byla pořízena fotografická dokumentace. Pokus probíhal ve dvou opakováních.

Obr. III: Metoda difuze proteinu agarem – rozmístění terčů



Tab. VIII: Stupnice antifungální aktivity proteinu (Huynh et al, 1996)

Antifungální aktivita proteinu	Označení
Neaktivní	-
Aktivní	+
Středně aktivní	++
Silně aktivní	+++
Velmi silně aktivní	++++

Převzato z SCHLUMBAUM et al. 1986; HUYNTH et al. 1996

Sledování vlivu proteinu na klíčivost spor vybraných houbových organismů

Vzhledem ke skutečnosti, že předcházející způsob hodnocení je do jisté míry subjektivním hodnocením inhibiční aktivity, byl tento pokus doplněn o hodnocení vlivu proteinu na klíčivost reprodukčních struktur (konidií u druhu *Fusarium solani*).

50 µl konidiové suspenze $1,00 \times 10^4$, která byla připravena podle metodiky uváděné výše, bylo přeneseno do sterilní mikrocentrifugační zkumavky. Sterilní protein (cca 50 mg/ml) byl v množství 100 µl přidán k této suspenzi. Kontrola představovala stejné množství pufru, ve kterém byl protein rozpuštěn. Konidie byly vystaveny působení proteinu po dobu 24 hodin při

teplotě cca 25°C. Poté byl proveden standardní test klíčivosti a dosažené hodnoty byly porovnány s výsledky kontroly.

Standardní test klíčivosti – GI („Germination Index“)

Cílem testu je zjistit procento klíčivosti a stupeň naklíčení příslušné populace konidií. Pomocí laboratorní kličky byla suspenze z mikrocentrifugační zkumavky nanesena ve formě kapek na povrch agarové vrstvy (2% vodní agar na podložním sklíčku). Po zaschnutí kapek bylo podložní sklíčko s houbou vloženo do vlhké komůrky. Růst konidií probíhal na světle, při pokojové teplotě cca 22°C. Vyhodnocení vzorků se provedlo po 24, 48 a 72 hodinách pomocí světelného mikroskopu. Při vyhodnocení bylo hodnoceno minimálně 100 konidií z každého vzorku, přičemž ke každé konidii byl přiřazen příslušný index GI (0 - 3 v intervalu 0,5; viz. Tab. IX), který přesně specifikuje stupeň naklíčení a vývoj houby. Z takto vyhodnocených vzorků bylo spočítáno procento naklíčených konidií a průměrný index klíčivosti (LANDA 1992).

Tab. IX: Tabulka hodnocení klíčivosti (*Germination Index*, GI)

Index naklíčení (GI)	Charakteristika hodnoty
0	na konidii nejsou patrné žádné morfologické změny
0,5	1. konidie je zřetelně protáhlejší 2. vytváří se jednostranný klíček v poměru 1:0,5
1,0	velikost klíčku je v poměru 1:1
1,5	1. klíček je 2–3x větší než matečná konidie 2. na matečné konidii jsou zřetelné dva kratší klíčky
2,0	klíček je 3x tak dlouhý jako matečná konidie
2,5	na hyfách jsou zjištěny konidiofory bez nových konidií nebo s jednou konidií
3,0	v hodnoceném vzorku jsou zjištěny konidiofory, na kterých jsou krátké řetězky konidií; alespoň 5 konidií v řetězku

Převzato z SCHLUMBAUM et al. 1986; HUYNTH et al. 1996

5. VÝSLEDKY

5.1. POPIS CELKOVÉHO PROTEINU

5.1.1. Základní údaje k pokusu

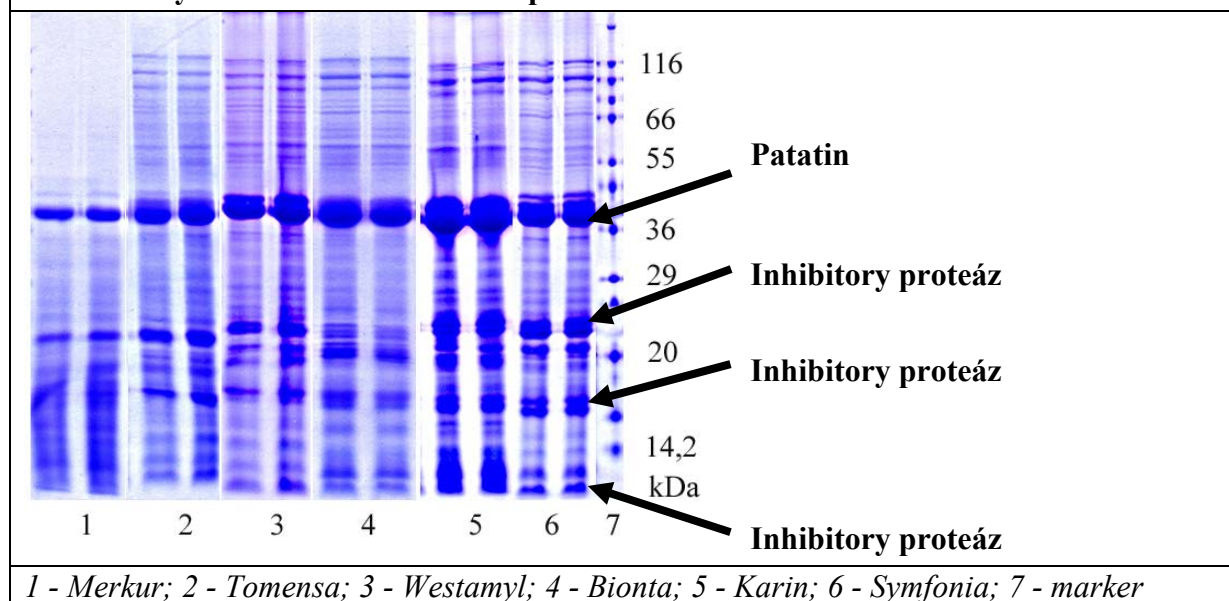
- První krok – precipitace celkového proteinu podchlazeným etanolem, centrifugace a promytí vzorků Na – acetátovým pufrem s etanolem, lyofilizace vzorků
- Druhý krok – zjištění podílu sušiny
- Třetí krok - odběr vzorků pro kontrolu purifikačního postupu a charakterizaci celkového proteinu pomocí SDS - PAGE

5.1.2. Výsledky

Tab. X: Podíl sušiny celkového hlízového proteinu u jednotlivých odrůd brambor

Odrůda	Podíl sušiny celkového proteinu na 30 ml hlízové vody
Bionta	202,5 mg
Karin	271,9 mg
Symfonia	362,1 mg
Merkur	425,2 mg
Tomensa	606,6 mg
Westamyl	471,2 mg

Obr. IV: Výsledek izolace celkového proteinu



Tab. XI: Procentické zastoupení frakcí v celkovém proteinu

Název odrůdy	Patatin	Skupina inhibitorů proteáz		
	39 – 43 kDa	21 - 25 kDa	14 - 20 kDa	0 – 14 kDa
Bionta	12,87	21,85	21,71	36,43
Karin	25,57	21,33	17,94	13,77
Symfonia	26,64	20,06	14,90	10,61
Merkur	26,07	24,64	14,28	14,28
Tomensa	27,57	16,14	16,29	21,62
Westamyl	24,33	20,15	20,92	14,06

5.1.3. Zhodnocení výsledků popisu celkového proteinu

Tab. X znázorňuje podíl sušiny celkového proteinu u jednotlivých odrůd. Nejvyšší hodnota (606,6 mg) byla zjištěna u odrůdy Tomensa, nejnižší u odrůdy Bionta (202,5 mg).

Na Obr. IV je patrné proteinové spektrum izolátů celkového hlízového proteinu získaného z jednotlivých odrůd. Horní šipka označuje patatin, který se v testovaných odrůdách nachází přibližně v oblasti 40 - 43 kDa. Inhibitory proteáz (zbývající šipky) se podle své molekulové hmotnosti dělí do tří skupin: 0 – 14, 14 – 20 a 21 -25 kDa. Jak je na první pohled patrné, tvoří u vybraných odrůd frakce patatinu a inhibitorů proteáz hlavní podíl v celkovém proteinu.

Konkrétní procentické zastoupení hlavních frakcí celkového proteinu je uvedeno v Tab. XI. Nejmarkantnější rozdíl v množství patatinu oproti ostatním testovaným genotypům (jejichž průměrný obsah patatinu tvořil cca 26 %) byl zjištěn u odrůdy Bionta, která obsahuje pouhých 12,9 % tohoto proteinu. Naopak inhibitory proteáz jsou u této odrůdy v porovnání se zbylými genotypy zastoupeny nejvíce. Nejvyšší obsah patatinu byl zjištěn u odrůdy Tomensa (cca 27,6 %).

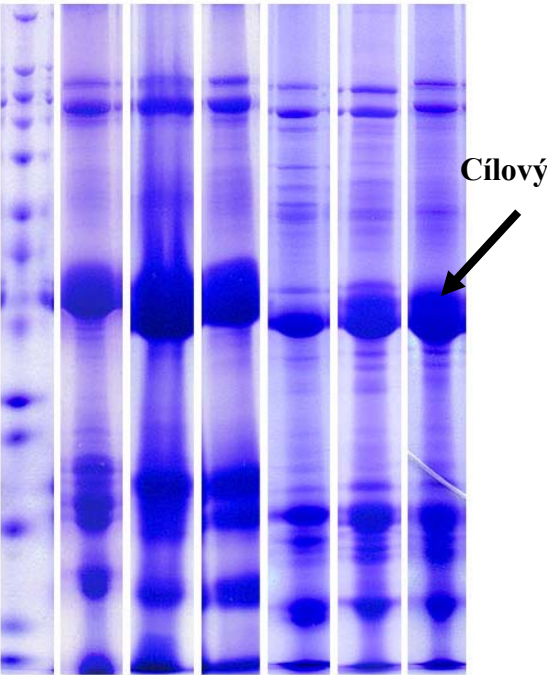
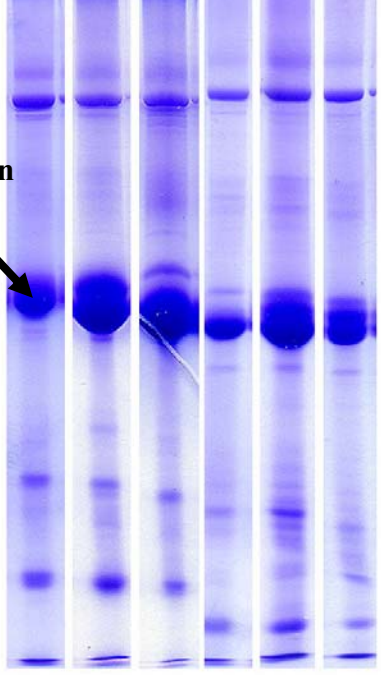
Variabilita v zastoupení celkového množství inhibitorů proteáz je mezi odrůdami velmi nízká, procentické hodnoty se pohybují od 45,5 do 55,5 %, pouze s výjimkou odrůdy Bionta, u které je hodnota významně vyšší 80 %. V zastoupení uvedených tří frakcí inhibitorů proteáz se již jednotlivé odrůdy odlišují. Lze je rozdělit na dvě skupiny, jedna skupina se vyznačuje nejvyšším podílem frakce o nejvyšší molekulové hmotnosti (21 - 25 kDa) – odrůdy Karin, Symfonia, Merkur a Westamyl, druhá skupina má nejvyšší podíl frakce o nejnižší molekulové hmotnosti (0 – 14 kDa) – Bionta.

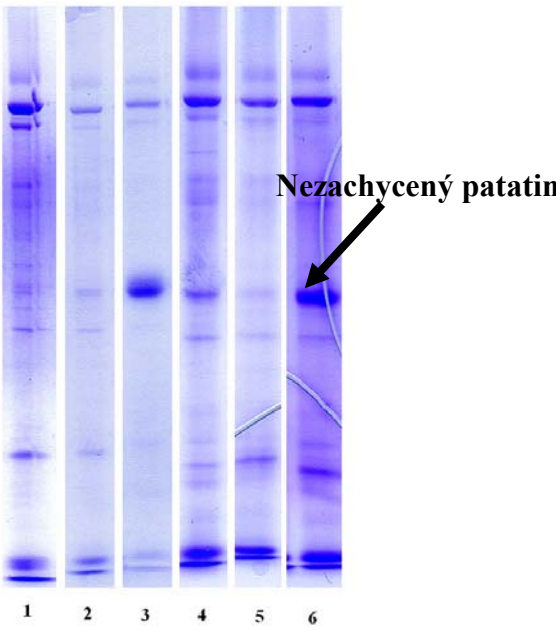
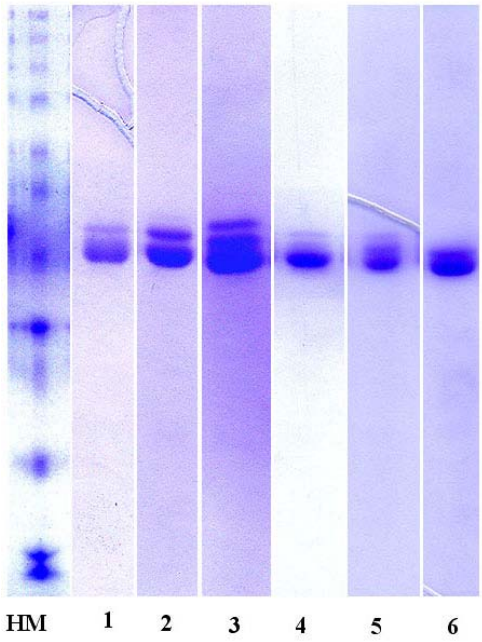
5.2. PURIFIKACE PATATINU

5.2.1. Základní údaje k pokusu

- Patatin byl purifikován ve dvoustupňovém postupu na základě známých biochemických vlastností
- První krok – chromatografická náplň DEAE zvolena na základě pI patatinu (4.8 – 5.2)
- Druhý krok – chromatografická náplň Con A zvolena na základě přítomnosti sacharidové části na bílkovinném řetězci
- Po každém purifikačním kroku odběr vzorků pro kontrolu purifikačního postupu pomocí SDS-PAGE

5.2.2. Výsledky

Obr. V: Ukázka zastoupení proteinových frakcí výchozího materiálu – bramborové šťávy u testovaných odrůd brambor	Obr. VI: První purifikační krok – ukázka proteinového spektra eluátu získaného pomocí DEAE chromatografické náplně
 <p>HM 1 2 3 4 5 6</p> <p>Cílový protein</p>	 <p>1 2 3 4 5 6</p>
<i>HM - hmotnostní marker; 1 - Merkur; 2 - Tomensa; 3 - Westamyl; 4 - Bionta; 5 - Karin; 6 - Symfonia.</i>	<i>1 - Merkur; 2 - Tomensa; 3 - Westamyl; 4 - Bionta; 5 - Karin; 6 - Symfonia.</i>

<p>Obr. VII: Druhý purifikační krok – ukázka bílkovinného spektra hlízových proteinů, které se nezachytily na chromatografickém médiu ConA</p>	<p>Obr. VIII: Výsledek dvoustupňové purifikace a kontrola čistoty získaného proteinu</p>
	
<p><i>1 - Merkur; 2 - Tomensa; 3 - Westamyl; 4 - Bionta; 5 - Karin; 6 - Symfonia.</i></p>	<p><i>HM – hmotnostní marker; 1 - Merkur; 2 - Tomensa; 3 - Westamyl; 4 - Bionta; 5 - Karin; 6 - Symfonia.</i></p>

5.2.3. Zhodnocení výsledků purifikace patatinových bílkovin

Obr. V znázorňuje celkové proteinové spektrum ve výchozím materiálu, šťávě bramborových hlíz zvolených odrůd. Šipka označuje patatin, který je cílovým proteinem purifikace. Patatin u testovaných genotypů se nachází přibližně v oblasti kolem 40 - 43 kDa. Z obrázku V (znázornění celkového hlízového proteinu) je již zřejmá kvalitativní i kvantitativní genotypová variabilita cílového proteinu. Odrůda Bionta vykazuje na rozdíl od ostatních testovaných odrůd zastoupení patatinu v mnohem menší míře. Naopak u odrůd Tomensa či Westamyl je v oblasti kolem 40 - 43 kDa zřejmé silné zastoupení proteinu.

Obr. VI znázorňuje první kontrolní bod po provedení prvního purifikačního kroku (DEAE). Vzhledem ke skutečnosti, že DEAE je slabý anex, má schopnost zachytit proteiny, jejichž pI se nachází v kyselé oblasti pH („kyselé proteiny“). Na zobrazovaném gelu (Obr. VI) jsou zachyceny spektra hlízových proteinů s pI v kyselé oblasti. Kromě cílového patatinu v oblasti kolem 40 - 43 kDa zůstává v eluátu ještě část inhibitorů proteáz (0 – 25 kDa) a

protein s vyšší molekulovou hmotností - cca 80 kDa. Z důvodů přítomnosti těchto necílových proteinů byl proveden druhý purifikační krok.

Obr. VII znázorňuje nezachycený protein z druhého purifikačního kroku. Jedná se o kyselé hlízové proteiny, které byly zachyceny na DEAE, ale vzhledem k nepřítomnosti sacharidového řetězce nebyly zachyceny na médiu Con A. V oblasti kolem 40 - 43 kDa je na tomto obrázku přítomen u některých odrůd (Tomensa, Westamyl, Symfonia) i patatin, který nebyl zachycen pravděpodobně z důvodů jeho vysokého obsahu a nedostatečné kapacity kolony.

Obr. VIII znázorňuje konečný výsledek purifikačního postupu. V celkovém spektru se nachází pouze protein v oblasti kolem 40 - 43 kDa, tedy patatin, u kterého je zřejmá kvalitativní i kvantitativní variabilita. Purifikační postup je hodnocen jako úspěšný. Získaný čistý protein je v následující kapitole blíže charakterizován.

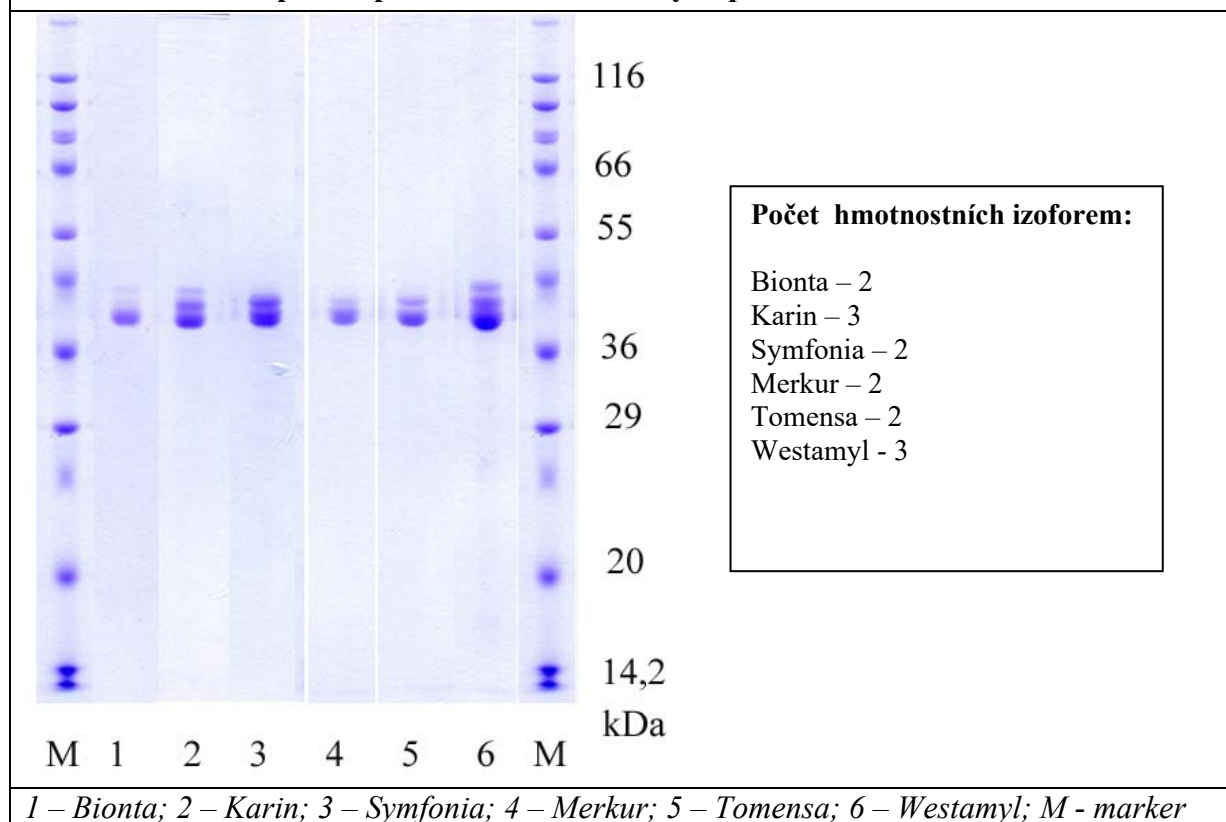
5.3. CHARAKTERIZACE PURIFIKOVANÉHO PATATINU

5.3.1. Základní údaje k pokusu

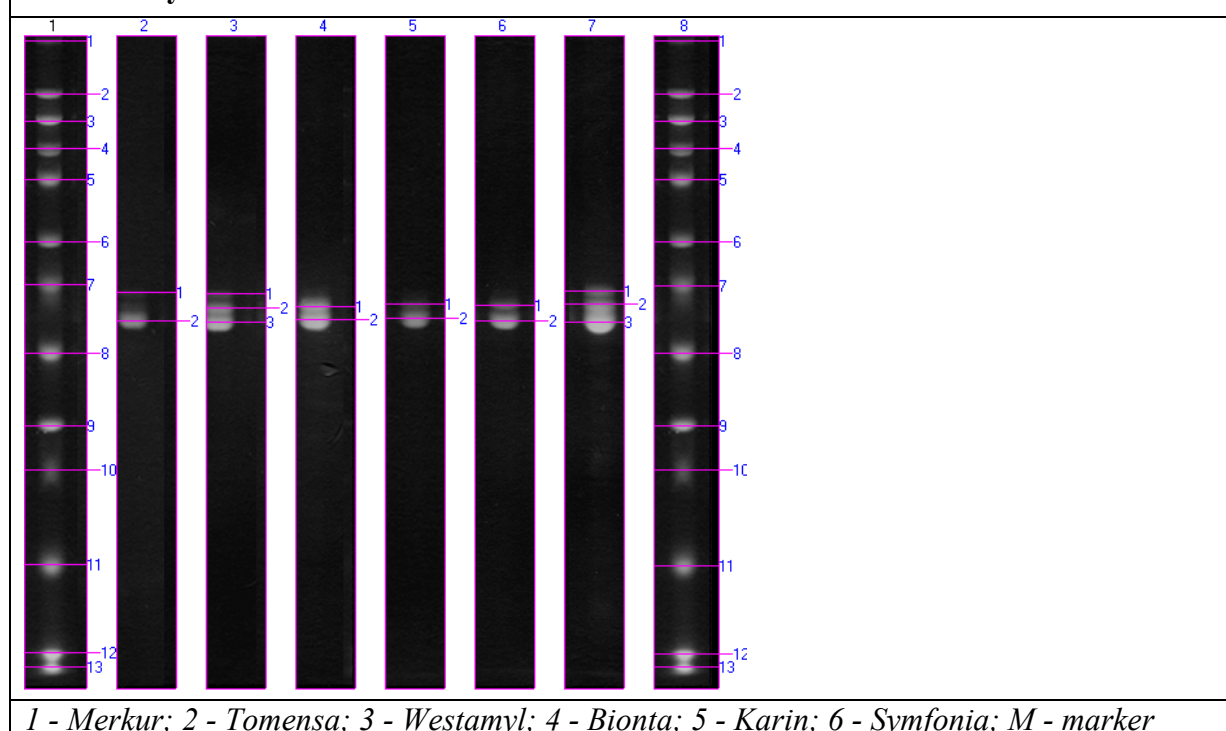
- První krok – charakterizace molekulové hmotnosti purifikovaného patatinu pomocí SDS – PAGE
- Druhý krok – hodnocení elektroforetické mobility jednotlivých bílkovinných frakcí patatinu technikou nativní PAGE
- Třetí krok - detekce a hodnocení esterázové aktivity patatinových bílkovin pomocí nativní PAGE
- Čtvrtý krok – hodnocení variability patatinových bílkovin v měnícím se gradientu pH pomocí Izoelektrické fokusace (IEF).

5.3.2. Výsledky

Obr. IX: Ukázka spekter patatinu denaturovaných pomocí SDS - PAGE



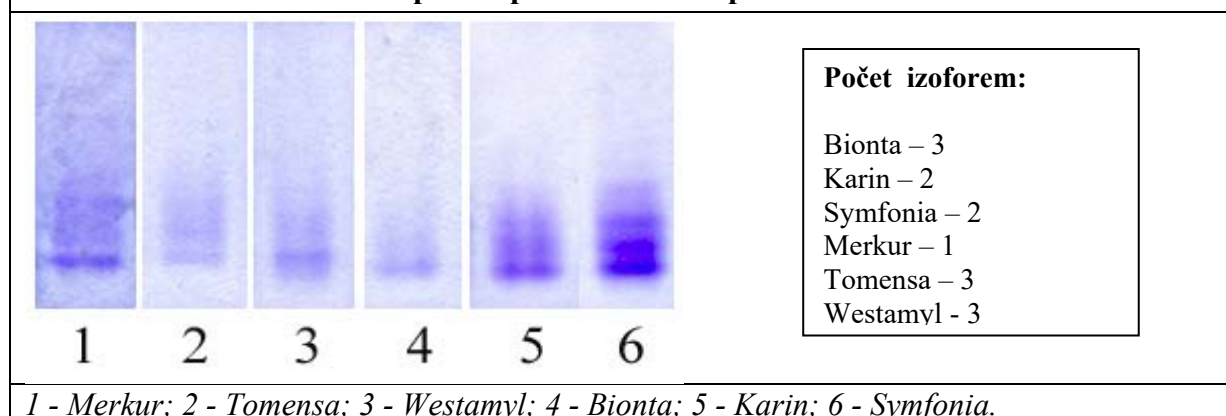
Obr. X : Bio profil denaturovaných patatinových spekter – slouží k výpočtu molekulových hmotností



Tab. XII: Hmotnostní izoformy patatinu u jednotlivých odrůd

Odrůda	Počet pruhů (izoform)	Molekulová hmotnost
Bionta	2	44,063 40,043
Karin	3	43,876 41,839 39,868
Symfonia	2	42,022 40,219
Merkur	2	42,390 40,397
Tomensa	2	42,206 40,043
Westamyl	3	44,250 42,390 39,868

Obr. XI: Ukázka nativních spekter purifikovaného patatinu

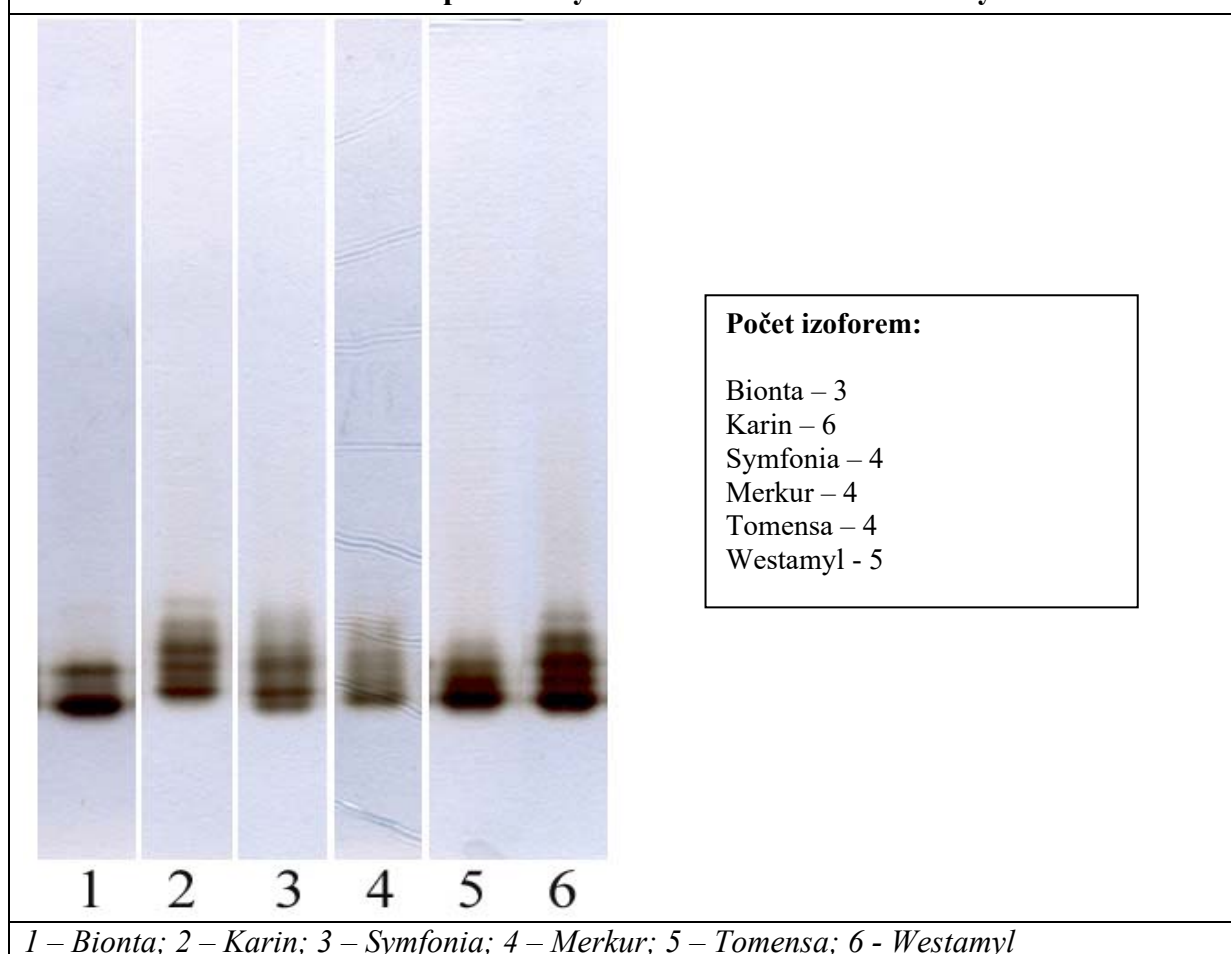


Tab. XIII: Relativní elektroforetická mobilita jednotlivých zón u nativního patatinu

Odrůda	1. zóna	2. zóna	3. zóna
Bionta	0,84	0,75	0,64
Karin	0,84	0,75	-
Symfonia	0,89	0,82	-
Merkur	0,88	-	-
Tomensa	0,89	0,82	0,70
Westamyl	0,88	0,80	0,70

Relativní elektroforetická mobilita = dráha od startu k pruhu / celková dráha

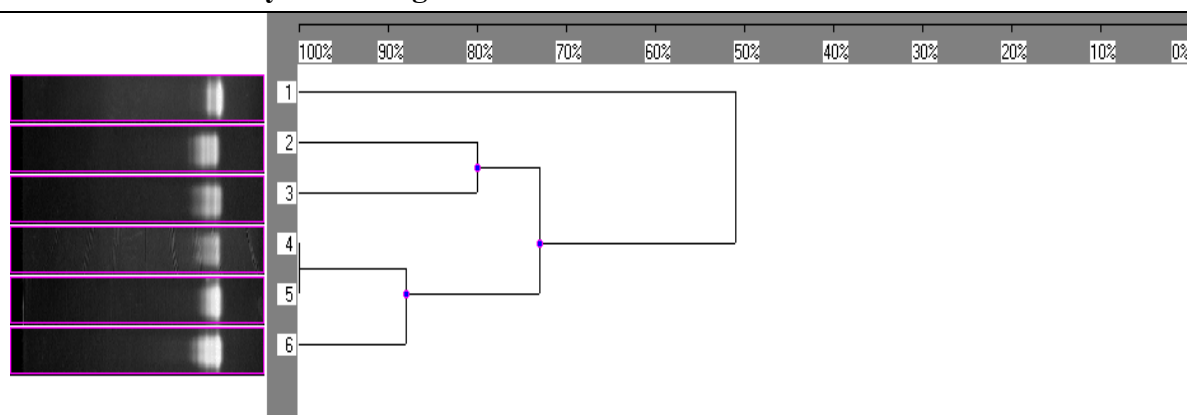
Obr. XII: Esterázová aktivita patatinových bílkovin – detekce izoenzymů esteráz



Tab. XIV: Relativní elektroforetická mobilita jednotlivých zón u esteráz

Odrůda	1. zóna	2. zóna	3. zóna	4. zóna	5. zóna	6. zóna
Bionta	0,82	0,79	0,77	-	-	-
Karin	0,81	0,78	0,77	0,75	0,72	0,69
Symfonia	0,82	0,80	0,77	0,75	-	-
Merkur	0,81	0,78	0,76	0,73	-	-
Tomensa	0,81	0,79	0,77	0,74	-	-
Westamyl	0,82	0,79	0,77	0,74	0,72	-

Obr. XIII: Esterázy – dendrogram

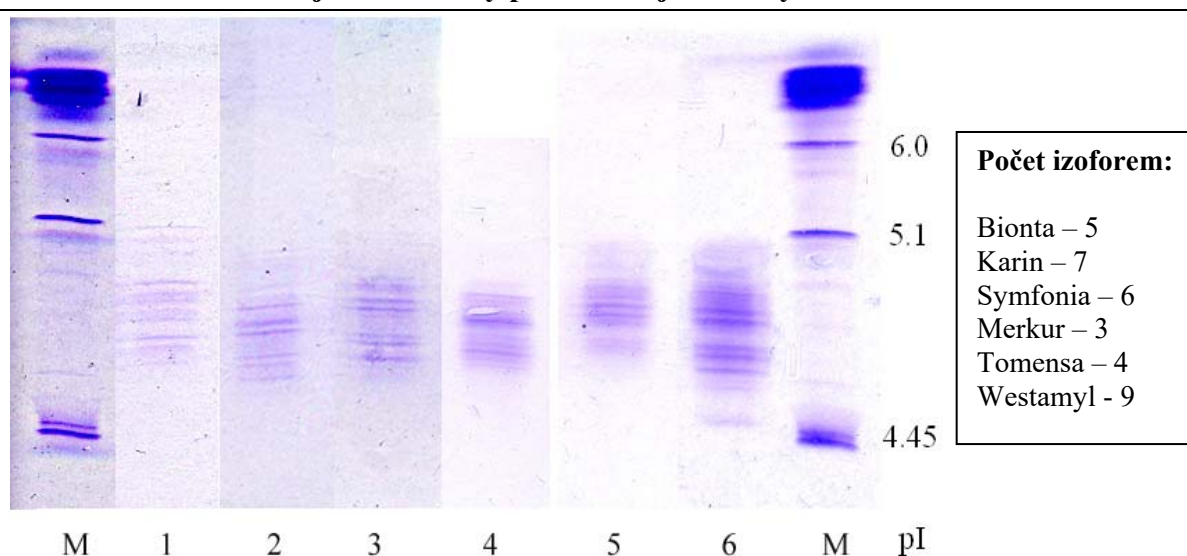


1 - Bionta; 2 - Karin; 3 - Symfonia; 4 - Merkur; 5 - Tomensa; 6 - Westamyl

Tab. XV: Esterázy – koeficient podobnosti mezi sledovanými odrůdami

	Bionta	Karin	Symfonia	Merkur	Tomensa	Westamyl
Bionta	1,00					
Karin	0,29	1,00				
Symfonia	0,57	0,80	1,00			
Merkur	0,67	0,67	0,67	1,00		
Tomensa	0,67	0,67	0,67	1,00	1,00	
Westamyl	0,57	0,80	0,80	0,89	0,89	1,00

Obr. XIV: IEF – nábojové izoformy patatinu u jednotlivých odrůd



1 - Bionta; 2 - Karin; 3 - Symfonia; 4 - Merkur; 5 - Tomensa; 6 - Westamyl

5.3.3. Zhodnocení charakterizace purifikovaného patatinu

Obr. IX znázorňuje spektra purifikovaného patatinu denaturovaného pomocí SDS-PAGE u zvolených odrůd. Denaturace proteinu pomocí SDS způsobila rozdělení jednotlivých patatinových frakcí pouze podle jejich molekulové hmotnosti. Ze získaných proteinových profilů byla pomocí softwaru Bioprofil (Obr. X) vypočítána molekulová hmotnost patatinových izoform u zvolených odrůd, viz. Tab. XII.

U odrůdy Karin a Westamyl byly zaznamenány 3 hmotnostní frakce patatinu, u zbývajících odrůd pouze 2 frakce. Hmotnostní variabilita jednotlivých frakcí mezi odrůdami je velmi nízká, hodnoty se pohybují kolem 40, 42 a 44 kDa. Z toho je patrné, že za odrůdový znak lze považovat počet frakcí patatinu, nikoliv hmotnost jeho jednotlivých frakcí.

Na Obr. XI jsou vidět nativní spektra purifikovaného patatinu jednotlivých odrůd. Při nativní PAGE nedochází k denuraci a látky jsou tedy děleny nejen podle své molekulové hmotnosti (SDS – PAGE), ale i podle náboje, který nesou. Od toho se odvíjí nejen rozdílný počet izoform oproti denaturovaným spektrům patatinu, ale i hodnoty relativní elektroforetické mobility, znázorněné v Tab. XIII. Hodnoty REM klesají od první zóny ke třetí, nejvyšší REM byla zjištěna u genotypů Symfonia a Tomensa.

Obr. XII ukazuje spektra izoenzymů esteráz u jednotlivých odrůd, Tab. XIV relativní elektroforetické mobility jednotlivých izoenzymů. Kvantitativní a kvalitativní variabilita patatinu v oblasti jeho esterázové aktivity je vyšší než v předchozím případě. Počty izoform u sledovaných odrůd se pohybují se od tří (Bionta) do šesti (Karin). Genetickou podobnost mezi hodnocenými odrůdami na úrovni purifikovaných esteráz vyjadřuje dendrogram na Obr. XIII a Tab. XV. Odrůdy Merkur a Tomensa vykazují stoprocentní podobnost, naopak odrůda Bionta je charakterem elektroforetického fenotypu přibližně z 50 % odlišná od ostatních hodnocených odrůd.

Výsledek posledního kroku charakterizace patatinu zachycuje Obr. XIV. Je na něm patrné rozdělení patatinových izoform u sledovaných odrůd v měnícím se gradientu pH, tedy podle izoelektrických bodů těchto izoform. Během této charakteristiky byla u patatinových proteinů prokázána nejvyšší variabilita. Počet zón na gelu (nábojových izoform) se u zkoumaných odrůd pohyboval od tří (Merkur) do devíti (Westamyl).

5.4. ANTIFUNGÁLNÍ TESTY

5.4.1. Základní údaje k pokusu

- První krok – hodnocení vlivu celkového proteinu ze zvolených odrůd brambor na modelové systémy fytopatogenních hub
- Druhý krok – hodnocení vlivu patatinu

5.4.2. Výsledky

Tab. XVI: Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Bionta a Westamyl

	<i>Fusarium solani</i> , kmen 1036	<i>Fusarium solani</i> , kmen 8079	<i>Rhizoctonia solani</i>
12 hod po aplikaci proteinu			
24 hod po aplikaci proteinu			
48 hod po aplikaci proteinu			

LEGENDA

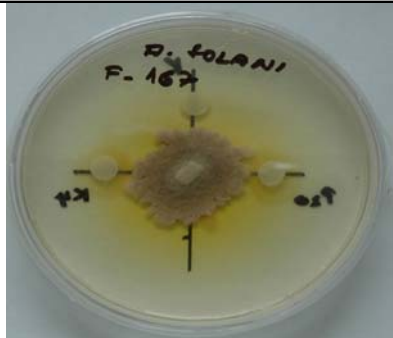
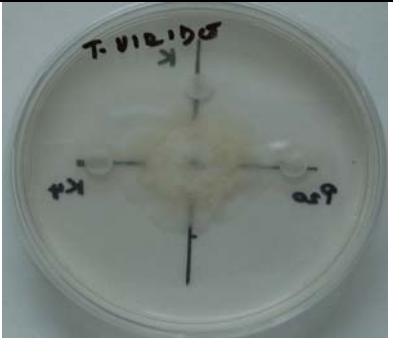
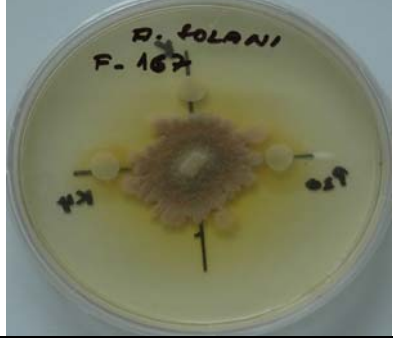

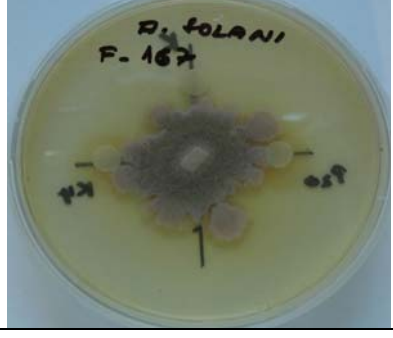
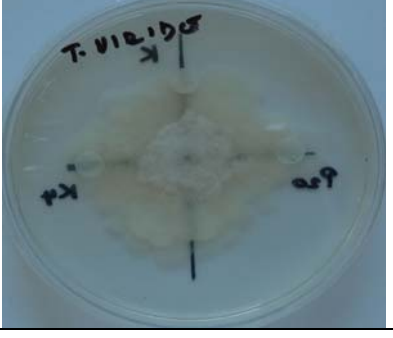
Fusarium solani – kmen 1036 – mycelium dosáhlo oblastí aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. U obou vzorků (Bionta K₄, Westamyl P₂₀) byla v této době zaznamenána

změna ve zbarvení mycelia v oblasti kontaktu s proteinem. Tato změna zbarvení byla pozorována i po 48 hodinách kultivace. Uvedené změny jsou na obrázcích znázorněny šipkami.

Fusarium solani – kmen 8079 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. U obou vzorků (Bionta K₄, Westamyl P₂₀) byla pozorována tvorba nepříliš výrazných inhibičních zón.

Rhizoctonia solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 12 hodinách kultivace. Nebyly pozorovány žádné změny v růstu a zbarvení mycelia.

Tab. XVI – pokračování (Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Bionta a Westamyl)

	<i>Alternaria solani</i>	<i>Trichoderma viride</i>
12 hod po aplikaci proteinu		
24 hod po aplikaci proteinu		
48 hod po aplikaci proteinu		


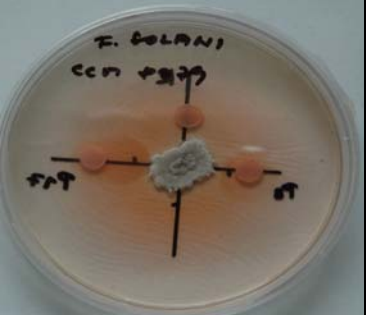
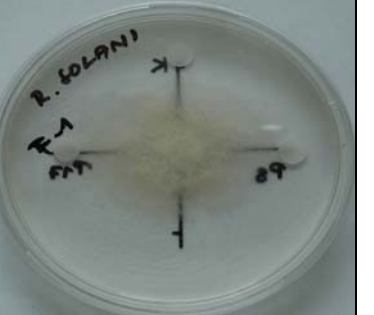



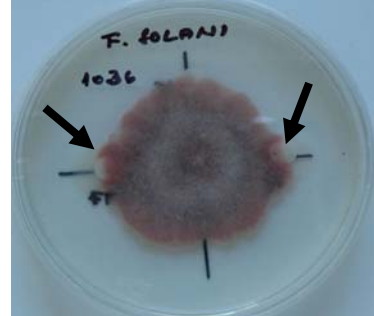
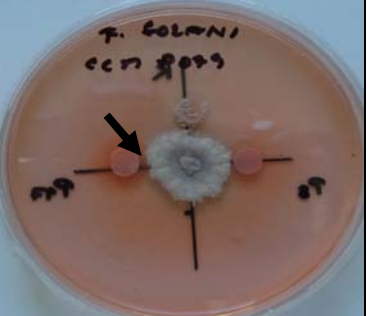

LEGENDA

Alternaria solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu z odrůdy Westamyl P₂₀ po 24 hodinách kultivace, oblasti aplikace proteinu z odrůdy Bionta K₄ po 48 hodinách

kultivace. Tato disproporce zřejmě není důsledkem inhibičního vlivu proteinu, ale nepravidelného růstu charakteristického pro tento druh houby.

Trichoderma viride - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány změny ve zbarvení mycelia ani žádné inhibiční zóny.

Tab. XVII: Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Tomensa a Merkur

	<i>Fusarium solani</i> , kmen 1036	<i>Fusarium solani</i> , kmen 8079	<i>Rhizoctonia solani</i>
12 hod po aplikaci proteinu			
24 hod po aplikaci proteinu			
48 hod po aplikaci proteinu			

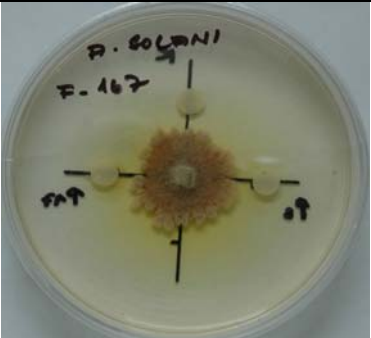
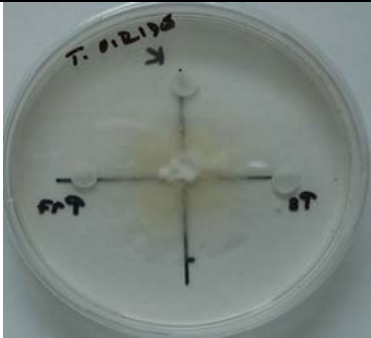
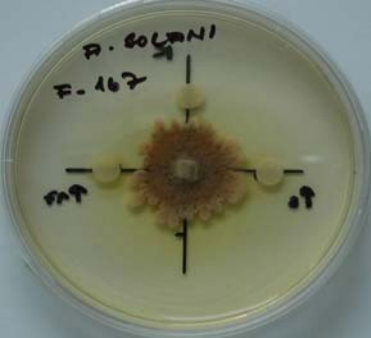
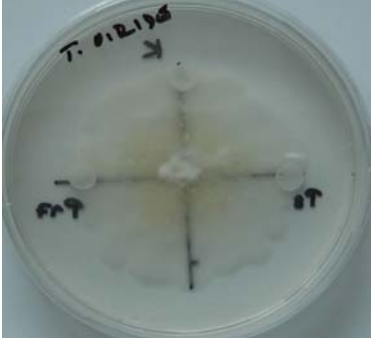
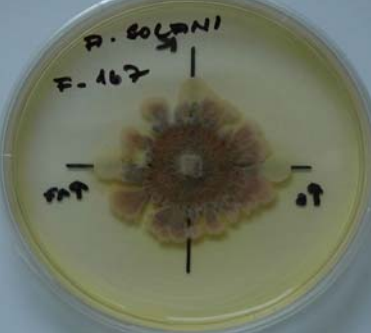
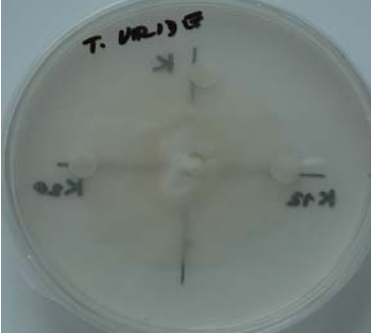
LEGENDA

Fusarium solani – kmen 1036 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. Po 24 i po 48 hodinách kultivace byla u obou vzorků (Merkur P₈, Tomensa P₁₇) zaznamenána změna ve zbarvení mycelia v oblasti kontaktu s proteinem.

Fusarium solani – kmen 8079 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 48 hodinách kultivace. V blízkosti terčičku s proteinem z odrůdy Tomensa P₁₇ byla vytvořena inhibiční zóna.

Rhizoctonia solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 12 hodinách kultivace. Nebyly pozorovány žádné změny v růstu a zbarvení mycelia.

Tab. XVII – pokračování (Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Tomensa a Merkur)

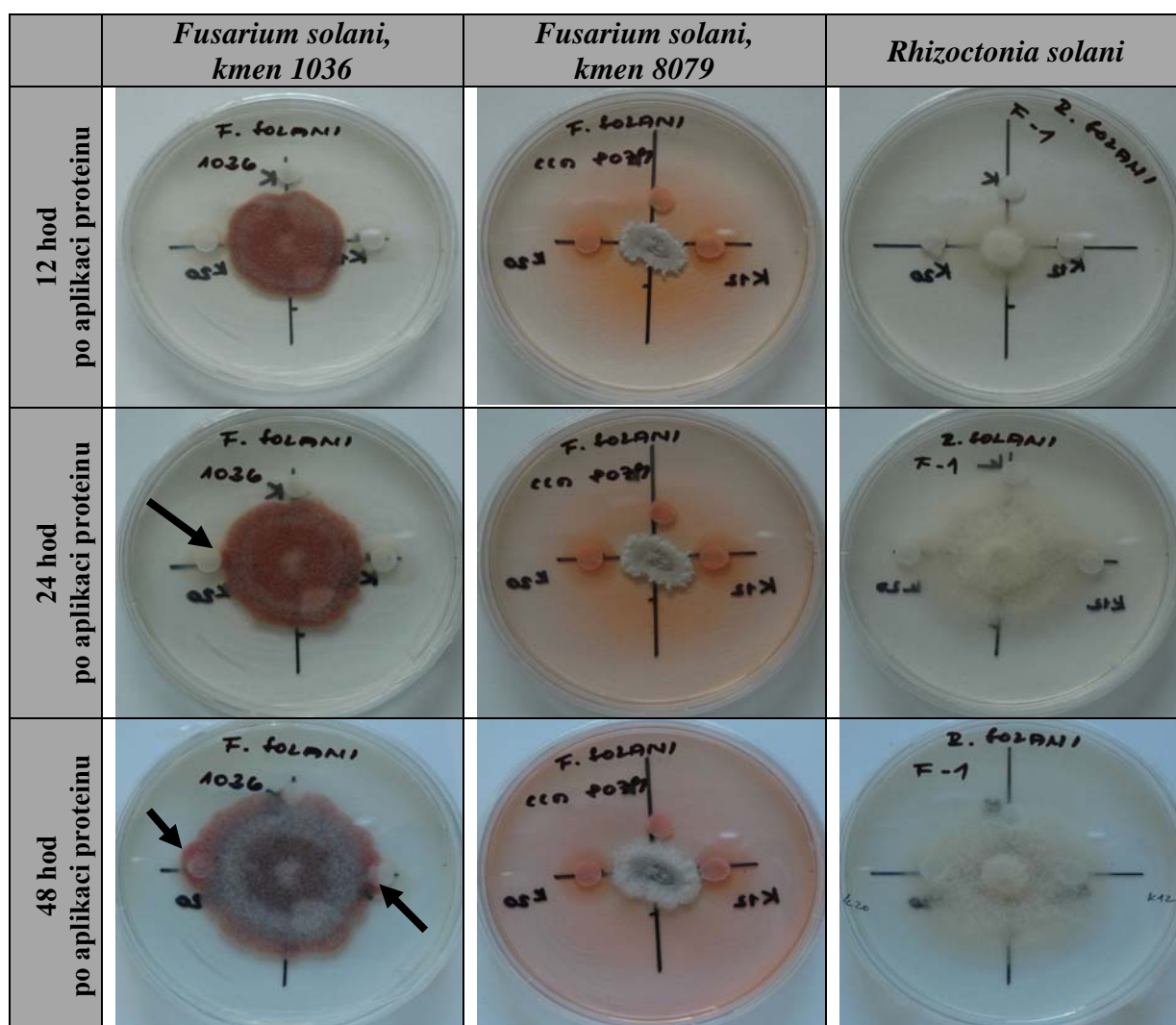
	<i>Alternaria solani</i>	<i>Trichoderma viride</i>
12 hod po aplikaci proteinu		
24 hod po aplikaci proteinu		
48 hod po aplikaci proteinu		

LEGENDA

Alternaria solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 48 hodinách kultivace. Nedošlo k vytvoření výrazných inhibičních zón.

Trichoderma viride - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány žádné změny v růstu či zbarvení mycelia.

Tab. XVIII: Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Karin a Symfonia




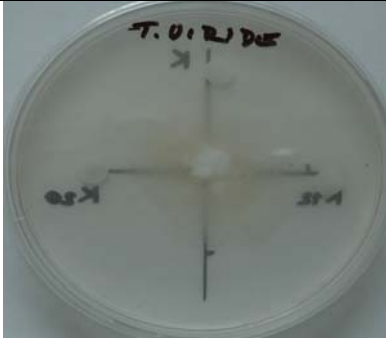
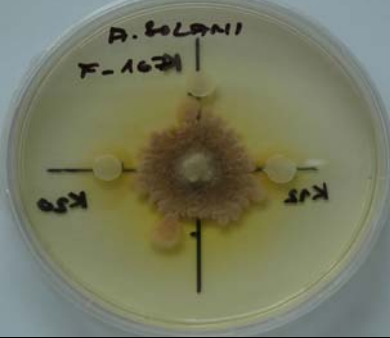
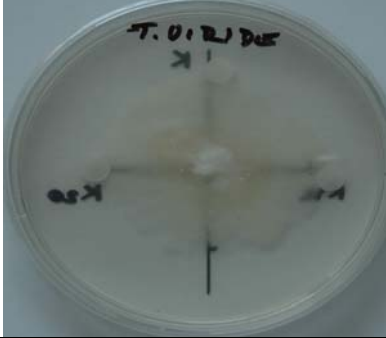


LEGENDA

Fusarium solani – kmen 1036 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 (u odrůdy Karin K₁₂) a po 48 (u odrůdy Symfonia K₂₀) hodinách kultivace. V blízkosti terčíku s proteinem z odrůdy Karin byla zaznamenána změna ve zbarvení mycelia po 24 hodinách kultivace, v oblasti působení proteinu z odrůdy Symfonia po 48 hodinách kultivace. Tento časový posun je patrně způsoben náhodnou nepravidelností v růstu testované houby.

Fusarium solani – kmen 8079 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 48 hodinách kultivace, a to pouze u vzorku z odrůdy Karin K₁₂. Nedošlo k tvorbě inhibičních zón.

Rhizoctonia solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány žádné změny v růstu či zbarvení mycelia.

Tab. XVIII – pokračování (Vybrané fotografie vlivu celkového proteinu z odrůd Karin a Symfonia)

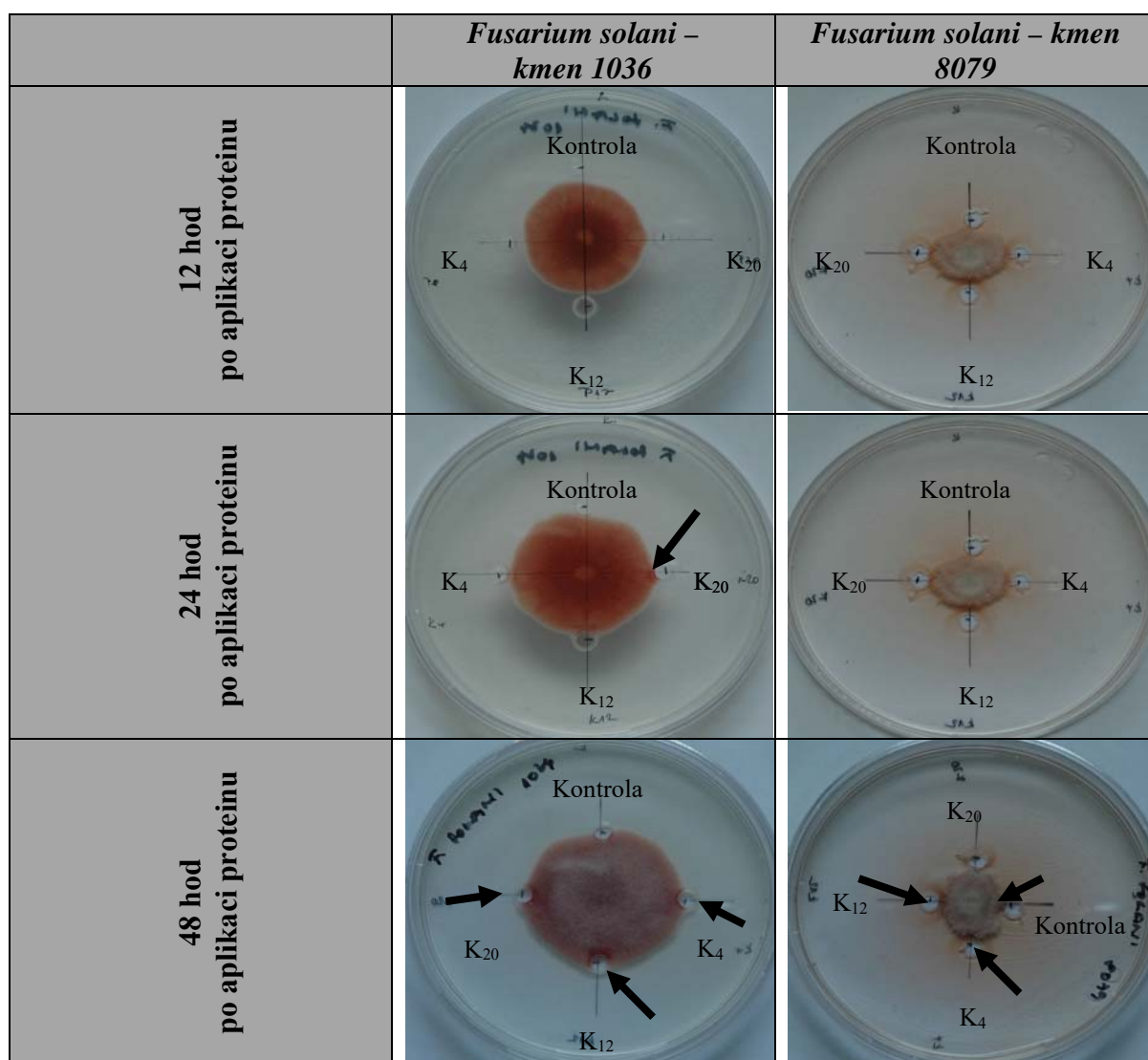
	<i>Alternaria solani</i>	<i>Trichoderma viride</i>
12 hod po aplikaci proteinu	 A petri dish containing a yellow agar medium. A central inoculum of <i>Alternaria solani</i> is visible, with handwritten labels 'D. SOLANI' and 'K-102' above it. Two smaller inocula are marked 'K9' and 'K12' on either side of the center.	 A petri dish containing a white agar medium. A central inoculum of <i>Trichoderma viride</i> is visible, with handwritten labels 'T. VIRIDE' and 'K-102' above it. Two smaller inocula are marked 'K9' and 'K12' on either side of the center.
24 hod po aplikaci proteinu	 A petri dish containing a yellow agar medium. The central inoculum of <i>Alternaria solani</i> has expanded significantly, reaching the protein application points marked 'K9' and 'K12'. Handwritten labels 'D. SOLANI' and 'K-102' are present.	 A petri dish containing a white agar medium. The central inoculum of <i>Trichoderma viride</i> has expanded slightly. Handwritten labels 'T. VIRIDE' and 'K-102' are present.
48 hod po aplikaci proteinu	 A petri dish containing a yellow agar medium. The central inoculum of <i>Alternaria solani</i> has further expanded, covering the area around 'K9' and 'K12'. Handwritten labels 'D. SOLANI' and 'K-102' are present.	 A petri dish containing a white agar medium. The central inoculum of <i>Trichoderma viride</i> has expanded further. Handwritten labels 'T. VIRIDE' and 'K-102' are present.

LEGENDA

Alternaria solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace a to pouze v blízkosti proteinu z odrůdy Karin K₁₂. Nedošlo k vytvoření výrazných inhibičních zón.

Trichoderma viride - mycelium dosáhlo oblasti aplikace proteinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány žádné změny v růstu či zbarvení mycelia.

Tab. XIX: Vybrané fotografie vlivu patatinu z odrůd Bionta, Karin a Symfonia

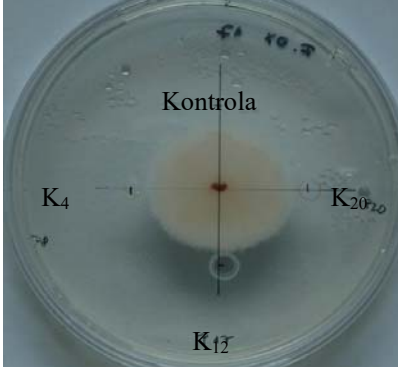
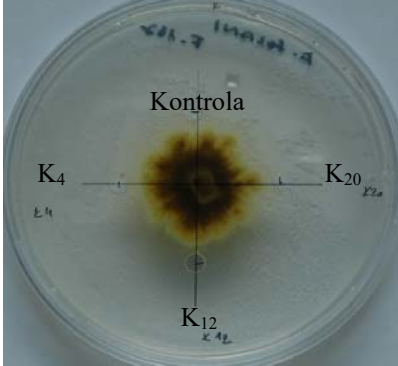
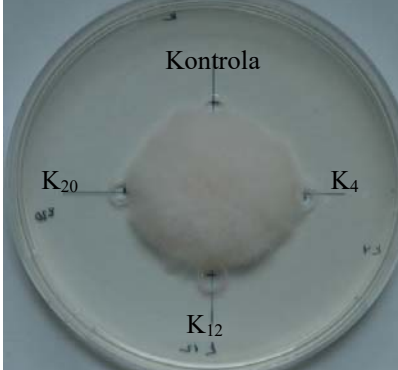
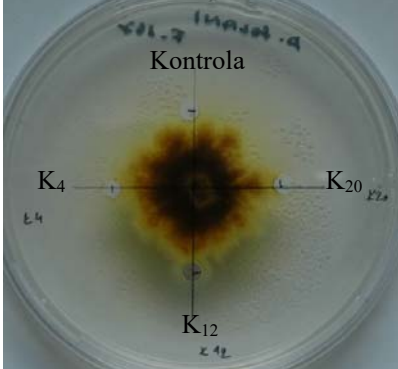
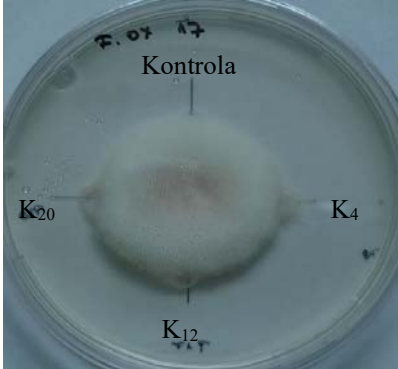
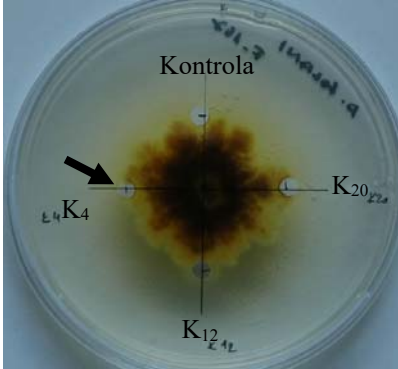


LEGENDA

Fusarium solani – kmen 1036 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 24 hodinách kultivace. Nedošlo k vytvoření výrazných inhibičních zón, ale po 48 hodinách byla u všech třech vzorků (Bionta K₄, Karin K₁₂, Symfonia K₂₀) zaznamenána změna ve zbarvení mycelia v oblasti kontaktu s patatinem (u odrůdy Symfonia již po 24 hodinách).

Fusarium solani – kmen 8079 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu již po 12 hodinách kultivace. U všech vzorků došlo k tvorbě inhibičních zón. Pozorována byla též změna ve zbarvení mycelia v blízkosti terčičků s patatinem ze všech tří odrůd (Bionta K₄, Karin K₁₂, Symfonia K₂₀).

Tab. XIX – pokračování (Vybrané fotografie vlivu patatinu z odrůd Bionta, Karin a Symfonia)

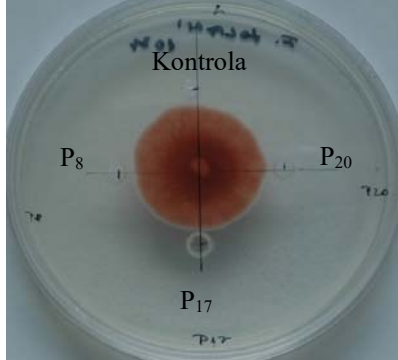
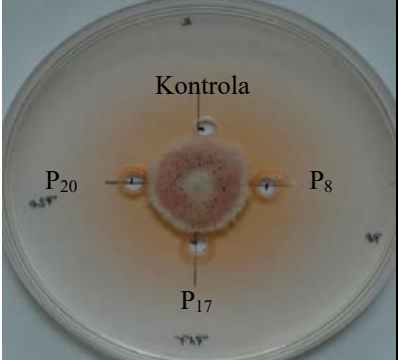
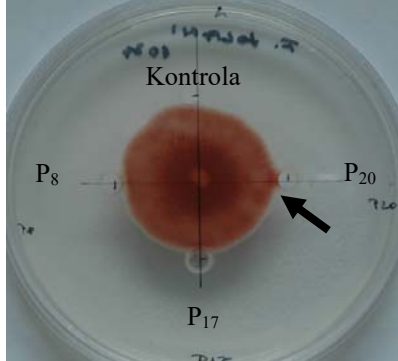
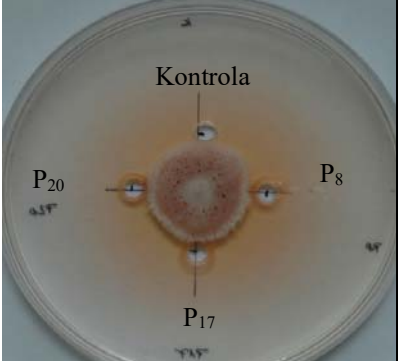
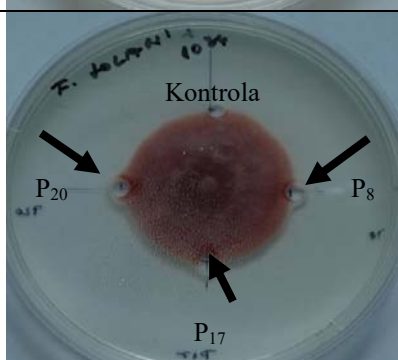
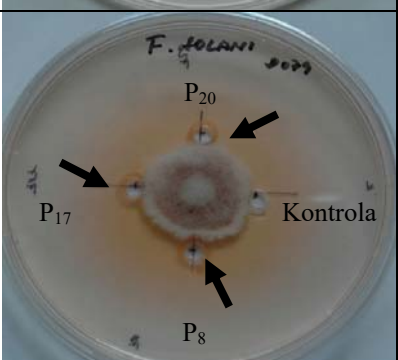
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria solani</i>
12 hod po aplikaci proteinu		
24 hod po aplikaci proteinu		
48 hod po aplikaci proteinu		

LEGENDA

Fusarium oxysporum - mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány žádné změny v růstu či zbarvení mycelia.

Alternaria solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 12 hodinách kultivace. Nepříliš výrazná inhibiční zóna byla vytvořena pouze v blízkosti místa aplikace proteinu z odrůdy Bionta K₄.

Tab. XX: Vybrané fotografie vlivu patatinu z odrůd Merkur, Tomensa a Westamyl

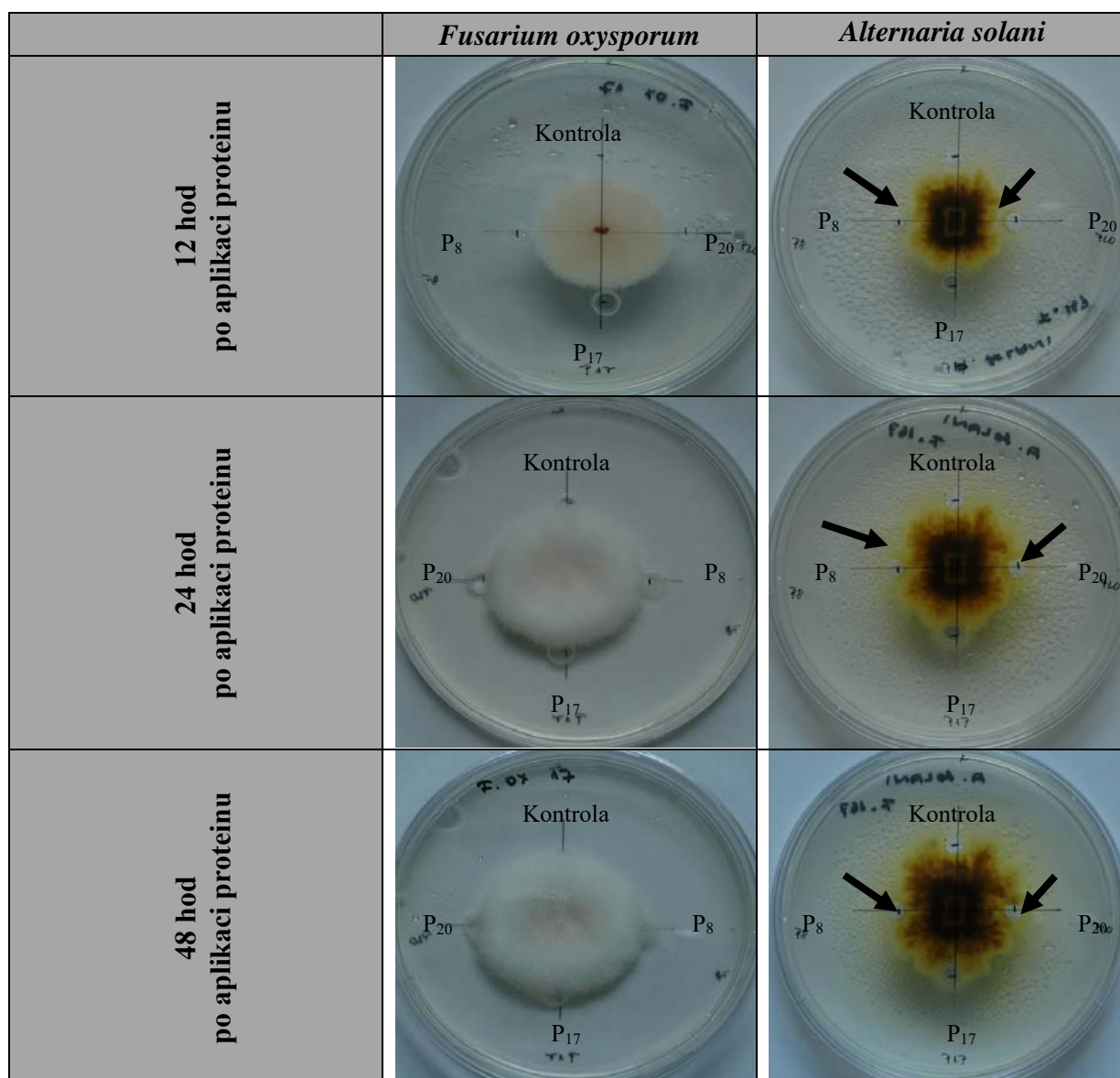
	<i>Fusarium solani</i> – kmen 1036	<i>Fusarium solani</i> – kmen 8079
12 hod po aplikaci proteinu		
24 hod po aplikaci proteinu		
48 hod po aplikaci proteinu		

LEGENDA

Fusarium solani – kmen 1036 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 24 hodinách kultivace. Nedošlo k vytvoření výrazných inhibičních zón, ale po 48 hodinách kultivace byla u všech tří vzorků (Merkur P₈, Tomensa P₁₇, Westamyl P₂₀) zaznamenána změna ve zbarvení mycelia v oblasti kontaktu s tímto proteinem (u odrůdy Westamyl již po 24 hodinách).

Fusarium solani – kmen 8079 – mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 48 hodinách kultivace. U všech vzorků byla zaznamenána tvorba inhibičních zón.

Tab. XX – pokračování (Vybrané fotografie vlivu patatinu z odrůd Merkur, Tomensa a Westamyl)



LEGENDA

Fusarium oxysporum - mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 24 hodinách kultivace. Nebyly zaznamenány žádné změny v růstu či zbarvení mycelia.

Alternaria solani - mycelium dosáhlo oblasti aplikace patatinu po 12 hodinách kultivace. U vzorků Merkur P8 a Westamyl P20 došlo k vytvoření středně výrazných inhibičních zón.

Tab. XXI: Procento klíčivosti a průměrný index naklíčení spor kultury *Fusarium solani*, kmen 8079 po 24 hodinách kultivace v přítomnosti purifikovaného patatinu testovaných odrůd

Odrůda	Průměrný index naklíčení (GI)	SMODCH	Procento klíčivosti	Slovní hodnocení
Bionta	1,937	0,462	87	zaznamenán výraznější inhibiční vliv proteinu
Karin	3,5	0,000	100	není zaznamenán žádný inhibiční vliv proteinu
Symfonia	2,099	0,311	92	inhibiční vliv proteinu minimální
Merkur	1,530	0,429	72	zaznamenán výraznější inhibiční vliv proteinu
Tomensa	2,881	0,422	98	inhibiční vliv proteinu minimální
Westamyl	2,986	0,346	98	inhibiční vliv proteinu minimální
Kontrola	3,5	0,000	100	kultura je zcela naklíčená, nebyl zaznamenán inhibiční vliv pufru Tris-HCl pH7.4

5.4.3. Zhodnocení antifungálních testů

Změny po aplikaci celkového hlízového proteinu během 48 hodin kultivace vykazaly 2 kmeny druhu *Fusarium solani*: *Fusarium solani* (kmen 1036) a *Fusarium solani* (kmen 8079). U druhů *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* a *Rhizoctonia solani* nebyla pozorována žádná reakce.

- *Fusarium solani* (kmen 1036) – u všech testovaných odrůd bylo zaznamenáno tmavší zbarvení mycelia houby v místě kontaktu s proteinem.
- *Fusarium solani* (kmen 8079) - k tvorbě inhibičních zón došlo v blízkosti terčičků s proteinem z genotypů Bionta, Westamyl a Tomensa.

Změny po aplikaci patatinu během 48 hodin kultivace vykazaly tyto druhy hub: *Fusarium solani* (kmen 1036), *Fusarium solani* (kmen 8079) a *Alternaria solani*. U druhů *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* a *Rhizoctonia solani* nebyla pozorována žádná reakce.

- *Fusarium solani* (kmen 1036) – u všech testovaných odrůd bylo zaznamenáno tmavší zbarvení mycelia houby v místě kontaktu s proteinem; tvorba nepřilíš výrazných inhibičních zón byla patrná v blízkosti terčičků s patatinem ze všech sledovaných odrůd.

- *Fusarium solani* (kmen 8079) - k tvorbě inhibičních zón došlo v blízkosti terčků s patatinem ze všech sledovaných odrůd. Klíčivost byla výrazně snížena v oblasti aplikace proteinu z odrůd Bionta a Merkur.
- *Alternaria solani* – k vytvoření inhibičních zón došlo v blízkosti terčků s proteinem z genotypů Bionta, Merkur a Westamyl.

Při hodnocení po 60 a 72 hodinách kultivace již nebyly u testovaných hub zaznamenány žádné změny. Důvodem byla pravděpodobně degradace proteinu v důsledku vysoké teploty (25 °C).

6. DISKUSE

6.1. CHARAKTERISTIKY CELKOVÉHO HLÍZOVÉHO PROTEINU

Obsah dusíkatých látek přítomných v bramborových hlízách závisí na genotypu a podmínkách prostředí. Obvykle se pohybuje kolem 2 % v čerstvé hmotě (DEBRE & BRINDZA 1996). Hlavní podíl na tomto obsahu mají dvě skupiny hlízových proteinů: patatin a inhibitory proteáz, které společně mohou představovat přes dvě třetiny (i více) obsahu proteinů v bramborových hlízách (BÁRTA & ČURN 2004). Během charakterizace celkového proteinu zkoumaných odrůd byl prokázán obsah těchto frakcí v rozmezí od 72,2 % (Symfonia) do 92,9 % (Bionta) z celkového hlízového proteinu (Tab. XI). Samotný glykoprotein patatin tvoří 20 – 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz (RALET & GUEGUEN 2001, POUVREAU et al. 2001), což se u zkoumaných odrůd potvrdilo s výjimkou odrůdy Bionta, u které podíl patatinu tvořil pouhých 12,9 %. Stanovený obsah inhibitorů proteáz přesáhl téměř ve všech případech hodnotu 50 % z celkových rozpustných bílkovin hlízové šťávy, shodně, jak uvádí u odrůdy Elkana ve své práci POUVREAU (2001). Zatímco se rozpětí mezi většinou sledovaných odrůd pohybovalo v užším intervalu, byl výrazný rozdíl opět zjištěn u odrůdy Bionta, bezmála 30 % (Tab. XI).

Patatinový komplex představuje skupinu imunologicky identických glykoproteinů přítomných ve všech odrůdách brambor včetně příbuzných divokých diploidů ze skupiny „Andigena“ a „Phureja“ (PINSIRODOM & PARKIN 2000). Během analýz byla zjištěna jeho molekulová hmotnost v rozmezí 39,9 až 44,3 kDa (Tab. XII), přičemž pouze horní hranice přesahuje hodnotu 43 kDa, uváděnou v novějších publikacích (POTS et al. 1999, POTS et al. 1998, PINSIRODOM & PARKIN 2000). Příčinou této odchylky by mohlo být jiné spektrum zkoumaných odrůd. Molekulové hmotnosti vyšší než 43 kDa byly zjištěny u patatinu z odrůd Bionta (44,1 kDa), Karin (43,9 kDa) a Westamyl (44,3 kDa). Pravděpodobně se jedná o hmotnostní izoformy s vyšším počtem glykosylací (POTS 1999).

Inhibitory proteáz se u rostlin podílejí na obraně proti atakujícímu hmyzu a mikroorganismům (BÁRTA & ČURN 2004). Rozdělení proteázových inhibitorů (Tab. XI) do tří skupin (0 – 14, 14 – 20 a 21 -25 kDa) bylo převzato z KONINGSVELD (2001). Toto rozdělení přesně neodpovídá jejich klasifikaci podle specializace na určitý typ proteázy. Např. nejpočetnější skupina inhibitorů proteáz, tzv. inhibitory Kunitzova typu které vykazují

primárně specifitu vůči trypsinu, mají molekulovou hmotnost mezi 18 – 24 kDa (POUVREAU 2004). Na proteinovém profilu SDS – PAGE byla tato zóna rovněž jasně patrná (viz Obr. IV).

6.2. PURIFIKACE PATATINU A JEHO CHARAKTERISTIKY

Patin byl purifikován z hlízové vody. Jak je patrné z výsledkové části (Obr. VIII), přinesl zvolený postup výsledky odpovídající zjištěním ostatních autorů (STIEKEMA 1988, SENDA et al. 1996, TONÓN et al. 2001). Hojně užívaný způsob purifikace zahrnující v prvním kroku iontovýměnnou a v druhém afinitní chromatografii (POTS et al. 1999) tedy byl shledán úspěšným.

Jak již bylo řečeno v minulé kapitole, vykazuje patatin hmotnostní a nábojový polymorfismus. Vyskytuje se tedy v několika formách (tzv. izoformách), které se shodují ve své funkci, ne však v primární struktuře (BÁRTA 2002). Výskyt patatinových izoform byl prokázán prostřednictvím níže uvedených elektroforetických technik.

SDS – PAGE je metodou, která mj. slouží k porovnání molekul výlučně podle jejich molekulové hmotnosti (GARFIN 1990). U vybraných odrůd byly pomocí této techniky zjištěny počty izoform patatinu lišících se svými molekulovými hmotnostmi (Obr. IX). U odrůdy Karin a Westamyl byly zaznamenány 3 izoformy, u zbývajících odrůd pouze 2 izoformy. Hmotnostní variabilita jednotlivých izoform mezi odrůdami se pohybovala kolem hodnot 40, 42 a 44 kDa, byla tedy nízká (Tab. XII). Protože podíl sacharidové části představuje asi 4% z relativní hmotnosti patatinové makromolekuly (POTS et al. 1998), je pravděpodobně příčinou této variability rozdílný počet glykosylací u jednotlivých izoform.

Native – PAGE dělí látky nejen podle molekulové hmotnosti, ale i podle elektrického náboje, který nesou (VODRÁŽKA 1982). Prostřednictvím této techniky byla zjištěna kvantitativní a kvalitativní variabilita nativního patatinu a patatinových esteráz podle hodnot relativní elektroforetické mobility. Jak uvádí GARFIN (1990), je elektroforetická mobilita u proteinových profilů pocházejících z Native – PAGE funkcí molekulových hmotností a náboje těchto proteinů. V případě hodnocení patatinu se počet izoform u sledovaných odrůd pohyboval od 1 (Merkur) do 3 (Bionta, Tomensa, Westamyl), viz Obr. XI a Tab. XIII. V případě esterázové aktivity - představované u patatinu aktivitou lipid acyl hydrolázy (JIMENEZ et al. 2002) a fosfolipázy A₂ (SENDA et al. 1996) – byla téměř u všech sledovaných odrůd pozorována variabilita vyšší, viz Obr. XII a Tab. XIV. Počty izoform se pohybovaly od tří (Bionta) do šesti (Karin).

U amfoterních iontů, jako jsou bílkoviny, závisí velikost náboje na pH (PROSSER et al. 1989). Tohoto faktu bylo kromě Nativní PAGE využito ještě při hodnocení variability

nábojových izoform patatinu prostřednictvím Izoelektrické fokusace. Variabilita byla pozorována v měnícím se gradientu pH, kdy docházelo k rozdělení izoform podle jejich izoelektrických bodů (Obr. XIV). Počet zón (nábojových izoform) na gelu se u jednotlivých odrůd pohyboval od tří (Merkur) do devíti (Westamyl), variabilita byla tedy znatelně vyšší než při dělení podle molekulové hmotnosti.

6.3. HONOCENÍ VLIVU CELKOVÉHO PROTEINU A PATATINU NA VYBRANÉ DRUHY FYTOPATOGENNÍCH HUB

Některé proteiny z hlíz brambor vykazují antifungální aktivitu (THEIS & STAHL 2004, SELITRENNIKOFF 2001). Tato aktivita byla pozorována u následujících druhů fytopatogenních hub: *Fusarium solani* (oba testované kmeny - kmen 1036, kmen8079), *Alternaria solani*.

Po aplikaci celkového hlízového proteinu bylo u houby *Fusarium solani* (kmen 1036) pozorováno výrazně tmavší zbarvení mycelia v místě kontaktu s proteinem ze všech testovaných odrůd - viz Tab. XI, XII a XIII. Jak ve své práci uvádějí HONG & MENG (2003), vykazují některé proteiny vyšších rostlin aktivitu β -1,3-glukanázy. Jsou tedy schopné katalyzovat hydrolýzu β -1,3-glykosidických vazeb β -1,3-glukanů, nejhojnější složky buněčných stěn hub. Tak je oslabena mechanická pevnost buněčných stěn, což obvyčejně vyústí až v lyzi houbových buněk. Lyze buňky je spojena se ztrátou vody, která by teoreticky mohla být příčinou tmavšího zbarvení v místě kontaktu mycelia s bramborovým proteinem. U houby *Fusarium solani* (kmen 8079) se změny ve zbarvení mycelia neobjevily, došlo však k tvorbě inhibičních zón v blízkosti terčků s proteinem z odrůd Bionta, Westamyl a Tomensa, jak je patrné z Tab. XI a XII. U druhů *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* a *Rhizoctonia solani* nebyla zaznamenána žádná reakce - viz Tab. XI, XII a XIII.

Po aplikaci patatinu byl na citlivé druhy hub (*Fusarium solani* (kmen 1036), *Fusarium solani* (kmen 8079) a *Alternaria solani*) pozorován výraznější inhibiční efekt než po aplikaci celkového proteinu. Důvodem je pravděpodobně vyšší koncentrace čistého patatinu, který je schopen omezit růst hub testovaných *in vitro* (TONÓN et al. 2001). Jak je patrné z Tab. XIX a XX, druh *Fusarium solani* (kmen 1036) vykázal opět u všech testovaných odrůd tmavší zbarvení mycelia v místě kontaktu s proteinem. Na rozdíl od testů s celkovým proteinem se navíc objevila tvorba inhibičních zón v blízkosti terčků s patatinem ze všech sledovaných odrůd (největší rozdíl byl patrný po 48 hodinách kultivace). Stejná reakce byla zaznamenána u

druhu *Fusarium solani* (kmen 8079), u kterého byla rovněž pozorována tvorba inhibičních zón v blízkosti všech terčků s patatinem (Tab. XIX a XX). Klíčivost byla výrazně snížena v oblasti aplikace proteinu z odrůd Bionta a Merkur (Tab. XXI). Vyšší efekt patatinu oproti celkovému proteinu se projevil i u druhu *Alternaria solani*, u kterého došlo k vytvoření inhibičních zón v blízkosti terčků s proteinem z odrůd Bionta, Merkur a Westamyl (Tab. XIX a XX). U druhů *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* a *Rhizoctonia solani* nebyla zaznamenána žádná reakce (Tab. XIX a XX).

Protože kultivace uvedených druhů hub probíhala při 25 °C, je pravděpodobné, že v této vysoké teplotě postupně docházelo k degradaci aplikovaného proteinu. To je zřejmě důvodem, proč již po 60 a 72 hodinách kultivace nebyly u žádné ze zkoumaných hub pozorovány změny.

Největší antifungální efekt v rámci testovaných odrůd vykázal patatin z odrůd Bionta a Merkur. Zajímavé je, že tyto dvě odrůdy zároveň vynikají oproti ostatním testovaným odrůdám vysokou odolností proti Plísni bramborové v nati a také odolností proti plísňové hnilobě hlíz (ANONYM 4. 2004). Tato odolnost by teoreticky mohla mít určitou souvislost s odolností proti napadení jinými druhy fytopatogenních hub (např. *Fusarium solani* a *Alternaria solani*), jak napovídají výsledky antifungálních testů. TONÓN et al. (2001) uvádí, že patatin disponuje mj. aktivitou β -1,3-glukanázy. Prostřednictvím tohoto enzymu se pravděpodobně brambory brání vůči napadení Plísni bramborovou (TONÓN et al. 2002).

Jako možná příčina zjištěného vyššího antifungálního efektu u odrůd Bionta a Merkur se jeví přítomnost izoformy patatinu vykazující vysokou β -1,3-glukanázovou aktivitu. Zdá se tedy, že pro obranyschopnost rostliny vůči napadení patogenními houbami není příliš významná kvantita patatinu (Bionta obsahovala pouhých 12,87%), nýbrž jeho kvalita – tzn. přítomnost takové patatinové izoformy, která je schopna vyvolat antifungální efekt. K potvrzení této hypotézy je však zapotřebí hlubší studium.

7. ZÁVĚR

Na základě výsledků diplomové práce lze uvést následující závěry:

- Největší podíl bramborových proteinů představují patatin a inhibitory proteáz. Obsah patatinu se u sledovaných odrůd pohyboval přibližně mezi 13 % (Bionta) a 28 % (Tomensa) z celkového proteinu. Nejvyšší obsah inhibitorů proteáz byl zjištěn u odrůdy Bionta (80 %), nejnižší u odrůdy Symfonia (46 %).

- Použitý purifikační postup patatinu zahrnující v prvním kroku iontovýmennou a v druhém afinitní chromatografii byl shledán úspěšným.

- Patatin byl u odrůdy Karin a Westamyl zjištěn ve 3 hmotnostních izoformách, u zbývajících odrůd pouze ve dvou hmotnostních izoformách. Průměrné molekulové hmotnosti patatinu u jednotlivých odrůd činily: 41,1 kDa (Symfonia, Tomensa), 41,4 kDa (Merkur), 41,9 kDa (Karin), 42,1 kDa (Bionta) a 42,2 kDa (Westamyl). Hmotnostní variabilita jednotlivých izoform mezi odrůdami byla velmi nízká. Nábojová variabilita patatinových bílkovin byla naopak poměrně vysoká, pohybovala se od 3 (Merkur) do 9 izoform (Westamyl). V oblasti esterázové aktivity patatinu byla pozorována variabilita na úrovni 3 (Bionta) až 6 (Karin) izoform. Stoprocentní genetickou podobnost na úrovni purifikovaných esteráz vykazaly odrůdy Merkur a Tomensa, naopak odrůda Bionta byla charakterem elektroforetického fenotypu přibližně z 50 % odlišná od ostatních hodnocených odrůd.

- Inhibiční vliv bramborových proteinů byl pozorován na následující druhy hub: *Fusarium solani* a *Alternaria solani*. U hub druhů *Trichoderma viride*, *Rhizoctonia solani* a *Fusarium oxysporum* nebyly zaznamenány žádné změny. V porovnání s celkovým proteinem byl vliv patatinu na výše uvedené druhy výraznější, přičemž u patatinu z odrůd Bionta a Merkur byly zaznamenány nejlepší výsledky (procento klíčivosti spor kultury *Fusarium solani* - kmen 8079 - po 24 hodinách kultivace v přítomnosti patatinu purifikovaného z odrůdy Bionta bylo 87%, z odrůdy Merkur pouhých 72%; v blízkosti místa aplikace patatinu z obou těchto odrůd byla pozorována u druhů *Alternaria solani* a *Fusarium solani* tvorba inhibičních zón a u druhu *Fusarium solani* – především u kmene 1036 - změny ve zbarvení mycelia).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **AHMAN I. & MELANDER M., 2003:** Potato proteins, and other plant proteins, as potential transgenic resistance factors to pollen beetles in oilseed rape. *Annals of Applied Biology*, 143: 253 – 259.
2. **AL – SAIKHAN M. S. & HOWARD L. R. & MILLER JR. J. C., 1995:** Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.) *Journal of Food Science*, 60: 341 – 373.
3. **ANDREWS D. & BEAMES B. & SUMMERS M. & PARK W., 1988:** Characterization of the lipid acyl hydrolyse activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journals*, 252: 199 – 205.
4. **ANONYM 1., 1986:** Kvalita stolních a konzumních brambor a její ovlivnění. 1.vydání. Socialistická akademie, Havlíčkův Brod, 141 p.
5. **ANONYM 5., 1994:** Protein electrophoresis – application guide. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, 160 p.
6. **ANONYM 4., 2004:** Brambory – přehledy odrůd. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 110 p.
7. **ANONYM 2., 2006:** Izolace enzymů. [citace dle 26. 2. 2006]. Dostupné na www.usbe.cas.cz/people/safarik/Prednasky-na-JcU/Enzymologie/isolace-enzymu.ppt
8. **ANONYM 3., 2006:** Ultrafiltrace. [citace dle 26. 2. 2006]. Dostupné na http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/ultrafiltrace.html
9. **BÁRTA J. & ČURN V., 2004:** Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické listy*, 98: 373 – 378.
10. **BÁRTA J., 1997:** Charakteristika enzymového a bílkovinného spektra v hlízách brambor pomocí elektroforézy. Diplomová práce. JČU, ZF, České Budějovice, 82 p.
11. **BÁRTA J., 2002:** Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor. Doktorská disertační práce. JČU, ZF, České Budějovice, 191 p.
12. **ČAČA Z. & KOLLÁR J. & NOVÁK J. B. & ZVÁRA J., 1981:** Zemědělská fytopatologie. 1. vydání. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 31 – 32.

13. ČERNÝ J. & ŠAŠEK A., 1998: Stanovení odrůdové pravosti pšenice a ječmene elektroforézou bílkovinných genetických markerů. Metodiky pro zemědělskou praxi, 6/1998. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 85 p.
14. DEBRE F. & BRINDZA J., 1996: Genotypy zemiakov z pohľadu produkcie a úžitkovej hodnoty. Rostlinná výroba 42: 509 – 515.
15. GARFIN D. E., 1990: One - dimensional gel electrophoresis IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): Methods in enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc. , San Diego, Chapter 33: 425 – 441.
16. GEGENHEIMER P., 1990: Preparation of extracts from plants IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): Methods in enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 14: 174 – 194.
17. GERALD C., 1990: Purification of glycoproteins IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): Methods in enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 40: 529 - 539.
18. HEŘMANOVÁ V., BÁRTA J., ČURN V., 2006: Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. V tisku.
19. HIRSCHBERG H. & SIMONS J. & DEKKER N. & EGMOND M., 2001: Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. European Journal of Biochemistry, 268: 5037 – 5044.
20. HONG T. Y. & MENG M., 2003: Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 472 – 478.
21. HUYNTH K. & BORGMEZER J. R. & SMITH C. E. & BELL L. D. & SHAH D. M., 1996: Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. Biochemical Journal, 316: 723 – 727.
22. JIMENEZ M. & ESCRIBANO J. & GANDIA F. – HERRERO F. & CHAZARRA S. & CABANES J. & GARCIA CARMONA F. & PEREZ – GILABERT M., 2002: Characterization of patatin esterase activity in AOT – isooctane reverse micelles. Biotechnology Progress, 18: 635 – 640.
23. JŮZL M. & PULKRÁBEK J. & DIVIŠ J., 2000: Rostlinná výroba III – okopaniny. 1. vydání. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 222 p.

- 24. KAZDA J. & JINDRA Z. & KABÍČEK J. & PROKINOVÁ E. & RYŠÁNEK P. & STEJSKAL V., 2001:** Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. 2. vydání. Redakce časopisu Farmář – zemědělec, Praha, 45 – 46.
- 25. KONINGSVELD VAN G., 2001:** Physico-chemical and functional properties of potato proteins. Stellingen behorende bij het proefschrift, Wageningen, 30 – 31.
- 26. KORNBERG A., 1990:** Why purify enzymes? IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): Methods in enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Vorchapter : 1 - 5.
- 27. KŮDELA & BARTOŠ P. & ČAČA Z. & DIRLBEK J. & FRIČ F. & LEBEDA A. & ŠEBESTA J. & ULRYCHOVÁ M. & VALÁŠKOVÁ E. & VESELÝ D., 1989:** Obecná fytopatologie. 1. vydání. Academia, Praha, 387 p.
- 28. LANDA Z., 1992:** Laboratorní protokol pracoviště ochrany rostlin. JCU, ZF, Katedra rostlinné výroby, České Budějovice.
- 29. LIU Y.W. & HAN CH. & 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. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 4389 – 4393.
- 30. MAJAMAA H. & SEPPALA U. & PALOSUO T. & TURJANMAA K. & KALKKINEN N. & REUNALA T., 2001:** Positive skin and oral challenge response to potato and occurrence of immunoglobulin E antibodies to patatin (Sol t 1) in infants with atopic dermatitis. Pediatric Allergy and Immunology, 12: 283 – 288.
- 31. MIGNERY G. A. & PIKAARD C.S. & HANNAPEL D. J. & PARK W. D., 1984:** Isolation and sequence – analysis of cDNAs for the major potato – tuber protein, patatin. Nucleic Acids Research, 12: 7987 – 8000.
- 32. OSTROVE S. & WEISS S., 1990:** Affinity chromatography : Specialized techniques. IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): Methods in enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 30: 371 - 380.
- 33. PINSIRODOM P. & PARKIN K. L., 2000:** Selective of celite-immobilized patatin (lipid acyl hydrolase from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers in esterification reactions as influenced by water activity and glycerol analogues as alcohol acceptors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 155 – 160.

- 34. POHL T., 1990:** Concentration of proteins and removal of solutes. IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): *Methods in enzymology*, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 7: 68 - 83.
- 35. POTS A. M. & JONGH DE H. H. J. & GRUPPEN H. & HESSING M. & VORAGEN A.G. J., 1998:** The pH dependence of the structural stability of patatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46: 2546 – 2553.
- 36. 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 10F mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1557 – 1564.
- 37. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2864 – 2874.
- 38. POUVREAU L., 2004:** Occurrence and physico – chemical properties of protease inhibitors from potato tuber. Wageningen University, Wageningen, 156 p.
- 39. PROCHÁZKA S. & MACHÁČKOVÁ I. & KREKULE J. & ŠEBÁNEK J., 1998:** *Fyziologie rostlin*. 1. vydání. Academia, Praha, 426 – 429.
- 40. PROCHÁZKOVÁ J., 1996:** Elektroforetická analýza proteinů v hlízách brambor vypěstovaných v různých zemědělských systémech. Diplomová práce. JČU, ZF, České Budějovice, 63 p.
- 41. PROSSER V. & BAKULE R. & BALGAVÝ P. & BENEŠ K. & ČÁPEK V. & ENGLICH J. & JANÁČEK K. & JELÍNEK O. & JELÍNKOVÁ E. & LUDVÍK J. & NEŠPŮREK S. & PANČOŠKA P. & PILAŘ J. & PILNÝ J. & SEDLÁK B. & ŠÍCHOVÁ H. & ŠTĚPÁNEK J. & VALVODA V. & VONDREJS V. & ZACHOVÁ J., 1989:** *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 712 p.
- 42. RACUSEN D., 1984:** Lipid acyl hydrolase of patatin. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 62: 1640 – 1644.
- 43. RALET M. C. & GUEGUEN J., 2001:** Foaming properties of potato raw proteins and isolated fractions. *Legend.-Wiss. U.-Technol.*, 34: 266 – 269.

- 44. ROSAHL S. & SCHMIDT R. & SCHNELL J. & WILLMITZER L, 1986:** Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato – tubers. *Molecular and General Genetics*, 203: 214 – 220.
- 45. ROSSOMANDO E. F., 1990:** Ion - exchange chromatography. IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): *Methods in Enzymology*, Vol. 182: *Guide to Protein Purification*. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 24: 309 - 317.
- 46. ROSYPAL S., 1994:** Přehled biologie. 2. vydání. Scientam s.r. o., Pedagogické nakladatelství, Praha, 68 – 215.
- 47. RYBÁČEK V., 1988:** Brambory. 1. vydání. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 360 p.
- 48. RYDEL T. J. & WILLIAMS J.M. & KRIEGER E. & MOSHIRI F. & STALLINGS W.C. & BROWN S. M. & PERSHING J. C. & PURCELL J. P. & ALIBHAI M. F., 2003:** The crystal structure, mutagenesis and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser – Asp catalytic dyad. *Biochemistry – Washington*, 42: 6696 – 6708.
- 49. SELITRENNIKOFF C. P., 2001:** Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2883 – 2894.
- 50. SENDA K. & DOOKE N. & KAWAKITA K., 1998:** Effect of mastoparan on phospholipase A₂ activity in potato tubers treated with fungal elicitor. *Plant and Cell Physiology*, 39: 1080 – 1086.
- 51. SENDA K. & YOSHIOKA H. & DOOKE N. & KAWAKITA K., 1996:** A cytosolic phospholipase A₂ from potato tissues appears to be patatin. *Plant and Cell Physiology*, 37: 347 - 353.
- 52. SEPPALA U. & ALENIUS H. & TURJANMAA K. & REUNALA T. & POLOSUO T. & KALKKINEN N, 1999:** Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *Journal of Allergy and Immunology*, 103: 165 – 171.
- 53. SHARMA N. & GRUSZEWSKI H. A. & PARK S.W. & HOLM D.G. & VIVANCO J.M., 2004:** Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 647 – 655.
- 54. SHEWRY P. R., 2003:** Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 91: 755 – 769.

- 55. SCHLUMBAUM A. & MAUCH F. & VOGELI U. & BOLLER T., 1986:** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 324: 36 – 367.
- 56. SCHMIDT M.H.H. & RAULF – HEIMSOTH M. & POSCH A., 2002:** Evaluation of patatin as a major cross – reactive allergen in latex – induced potato allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89: 613 – 618.
- 57. STELLWAGEN E., 1990:** Gel filtration. IN: DEUTSCHER M. P. (Ed.): *Methods in enzymology*, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, Inc., San Diego, Chapter 25: 317 - 329.
- 58. STEVENS D. A. & CALDERON L. & MARTINEZ M. & CLEMONS K. V. & WILSON S. J. & SELITRENNIKOFF C. P., 2002:** Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of *Candida vaginitis* model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 361 – 364.
- 59. STIEKEMA W. J. & HEIDEKAMP F. & DIRKSE W. G. & BECKUM VAN J. & HAAN DE P. & BOSCH TEN C. & LOUWERSE J. D., 1988:** Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11: 255 – 269.
- 60. 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 Physiology*, 109: 667 – 674.
- 61. TERRAS F. R., 1994:** Antifungal protein from Brassicaceae: their structure, expression and function. Dissertation. K. U. Leuven, Belgium, 163 p.
- 62. THEIS T. & STAHL U., 2004:** Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Science*, 61: 437 – 455.
- 63. TONÓN C. & DALEO G. & OLIVA C., 2001:** An acidic β -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 849 – 854.
- 64. TONÓN C. & GUEVARA G. & OLIVA C. & DALEO G., 2002:** Isolation of potato acidic 39 kDa β -1,3 glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology*, 150: 189 – 195.
- 65. VÁŇA J., 1998:** Systém a vývoj hub a houbových organismů. 2. vydání. Karolinum – nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, 9-10.
- 66. VODRÁŽKA Z., 1982:** Fyzikální chemie pro biologické vědy. 1. vydání. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 565 p.

- 67. VOKÁL B., 2005:** Naše bramborářství na prahu roku 2005. Úroda, Profi Press, s.r.o., 53, (1): 3 – 4.
- 68. WESTERMEIER R., 1993:** Electrophoresis in Practice. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 277 p.