

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hodnocení antifungální aktivity inhibitorů proteas z hlíz  
bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

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

Konzultanti diplomové práce: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

Ing. Andrea Kamenová

Autor diplomové práce: Bc. Jana Reiserová

České Budějovice, 2014



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů

V Českých Budějovicích dne 27.4.2014

Jana Reiserová

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za cenné rady, doporučení a spolupráci při vytváření této práce. Děkuji za spolupráci, doporučení a rady své konzultantce Ing. Andreje Kamenové a také Ing. Veronice Bártové., Ph.D.. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině za psychickou podporu.

## **Anotace**

Tato diplomová práce se zabývá inhibitory proteas izolovaných z hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) a hodnocením jejich antifungálních vlastností. Teoretická část pojednává o inhibitech proteas, které mají antifungální účinek. Jako materiál pro izolaci inhibitorů proteas pomocí separačních technik byly použity odrůdy Adéla, Ornella a Eurostarch. Proteinové frakce byly testovány proti vybraným mikroskopickým houbám rodu *Rhizoctonia* a rodu *Fusarium*, které jsou významnými patogeny v zemědělství. Jejich aktivita byla vyhodnocena a statisticky zpracována.

## **Klíčová slova**

Odrůdy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.), antifungální proteiny, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, inhibitory proteas

## **Abstract**

This diploma thesis is concerned on protease inhibitors isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and evaluation of their antifungal properties. Theoretical part of the thesis deals with protease inhibitors which have an antifungal effect. Tubers of potato cultivars – Adéla, Ornella, Eurostarch - were used for protease inhibitors isolation. Antifungal activity of isolated protein fractions were evaluated versus fungi from genus *Rhizoctonia* and *Fusarium* that are important pathogens in agriculture. Their activity was also evaluated statistically.

## **Key words**

Varieties of potato tuberous (*Solanum tuberosum* L.), Antifungal proteins, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, protease inhibitors

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>11</b>
2.1	HLÍZOVÉ PROTEINY BRAMBORU HLÍZNATÉHO ( <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.) .....	11
2.2	INHIBITORY PROTEAS.....	12
2.2.1	<i>Dělení inhibitorů proteas</i> .....	13
2.2.2	<i>Bramborový inhibitor I (PI-1)</i> .....	14
2.2.3	<i>Bramborový inhibitor II (PI-2)</i> .....	14
2.2.4	<i>Bramborový cysteinový inhibitor (PCPI)</i> .....	15
2.2.5	<i>Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI)</i> .....	15
2.2.6	<i>Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu (PKPI)</i> .....	15
2.2.7	<i>Ostatní serinové inhibitory proteas (OSPI)</i> .....	16
2.2.8	<i>Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas (PCI)</i> .....	16
2.2.9	<i>Izolace hlízových proteinů</i> .....	16
2.2.10	<i>Izolace bílkovin pomocí srážení</i> .....	17
2.2.11	<i>Izolace bílkovin pomocí separačních metod</i> .....	17
2.3	OBRANNÉ MECHANISMY ROSTLIN VŮČI HOUBÁM .....	21
2.3.1	<i>Rozdělení obranných mechanismů</i> .....	21
2.3.2	<i>Antifungální proteiny</i> .....	22
2.3.3	<i>Inhibitory proteas</i> .....	24
2.3.4	<i>Průmyslová výroba antifungálních peptidů</i> .....	28
2.4	HOUBY RODU <i>FUSARIUM</i> .....	29
2.4.1	<i>Charakteristika</i> .....	29
2.4.2	<i>Taxonomie</i> .....	29
2.4.3	<i>Rozmnožování a morfologie</i> .....	30
2.4.4	<i>Citlivost</i> .....	31
2.4.5	<i>Mykotoxiny</i> .....	31
2.4.6	<i>Fusarium solani</i> .....	35
2.4.7	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
2.4.8	<i>Fusarium graminearum</i> .....	37
2.4.9	<i>Fusarium culmorum</i> .....	37
2.5	<i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> .....	38
<b>3</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>41</b>
4.1	MATERIÁL .....	41
4.1.1	<i>Houby</i> .....	41
4.1.2	<i>Hlízy bramboru hlíznatého (<i>Solanum tuberosum</i> L.)</i> .....	41
4.2	PŘÍPRAVA PROTEINU .....	42
4.2.1	<i>Kvantifikace proteinu pomocí spektrofotometrie</i> .....	43
4.3	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA .....	44
4.4	TESTY ANTIFUNGÁLNÍ CITLIVOSTI.....	45
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>48</b>
5.1	KONCENTRACE PROTEINU.....	48
5.2	VYHODNOCENÍ PLOCHY INHIBICE RADIÁLNÍHO RŮSTU .....	48
5.2.1	<i>Hodnocení vlivu koncentrace</i> .....	51
5.2.2	<i>Hodnocení vlivu odrůdy</i> .....	52
5.2.3	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst <i>Fusarium graminearum</i>, kmen F-683</i> .....	53
5.2.4	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst <i>Fusarium solani</i>, kmen 8014</i> .....	53
5.2.5	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst <i>Fusarium solani</i>, kmen 8079</i> .....	54
5.2.6	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst <i>Fusarium oxysporum</i>, kmen 17</i> .....	55
5.2.7	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst <i>Rhizoctonia solani</i>, kmen F-1</i> .....	55

5.2.8	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst Fusarium oxysporum, kmen F-65</i> .....	56
5.2.9	<i>Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst Fusarium culmorum, kmen F-163</i> .....	57
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHA 1</b> .....	<b>67</b>



## Seznam použitých zkratk

SGE.....	Elektroforéza na škrobovém gelu
IEF.....	Isoelektrická fokusace
2D-PAGE.....	Dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SDS-PAGE.....	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí amonického detergentu dodecylsíranu sodného
PDA.....	Potato dextrose agar
PSA.....	Potato sucrose agar
MEA.....	Malt extract agar
ISA.....	Iso-sensitest agar
PFJ.....	Potato fruit juice
IEX.....	Ion-exchange Chromatography
HIC.....	Hydrophobic Interaction Chromatography

# 1 Úvod

Výskyt mykotoxinů způsobuje značné problémy v zemědělské produkci na celém světě. I při používání preventivních opatření na poli a během skladování, nelze jejich výskytu v krmných komoditách zcela zabránit. Díky zvýšenému zájmu o výzkum v této oblasti bylo moderními analytickými metodami identifikováno již více než 400 různých mykotoxinů. Toxicita různých mykotoxinů představuje vážný problém pro lidi i zvířata. Mykotoxikózy jsou nemoci zvířat a lidí způsobené pozřením mykotoxinů, jejich inhalací nebo kontaktem s kůží. Rozsah negativního vlivu mykotoxinů od imunosuprese a vlivu na užitkovost po hepatotoxický, nefrotoxický, neurotoxický, karcinogenní, reprodukční, teratogenní a gastrointestinální efekt závisí především na druhu a věku zvířat, celkovém zdravotním stavu, dále na faktorech prostředí (hygiena, teplota, koncentrace zvířat), druhu mykotoxinů, úrovni kontaminace krmiva a době působení.

Mykotoxiny jsou vysoce toxické sekundární metabolity mikroskopických hub především rodu *Fusarium*. Právě na tento z negativního hlediska nejvýznamnější rod nezabírají běžně prodávaná antimykotika. Proto je výzkum zaměřen na hledání nových látek, které by mohly růst těchto patogenů eliminovat. Velký potenciál by mohly mít proteiny z bramborových hlíz, a to inhibitory proteas. Právě inhibitorům proteas se tato práce věnuje a hodnotí jejich antifungální aktivitu a potenciál využití jako prostředku proti nebezpečným patogenům.

## 2 Literární přehled

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

Brambor hlíznatý je celosvětově významnou plodinou, jejíž hlízy slouží k výživě lidstva, zvířat a pro průmysl (Bárta & Čurn, 2004). Hlízu tvoří průměrně 75% vody a sušina (Hanusová & Čurn, 2006). Další látky obsažené v hlíze podléhají významné variabilitě, která závisí na odrůdě a prostředí ve kterém hlízy rostly. V sušině se mimo škrob, hlavní zásobní látku, nacházejí i další polysacharidy jako je vláknina, hemicelulóza, pektiny, hezózany, pentózany. Dále sušina obsahuje oligo- a monosacharidy, glykoalkaloidy (solanin), vitamín C, minerální látky, bílkovinné a nebílkovinné dusíkaté látky (volné aminokyseliny, amidy, asparagin, glutamin). Obsah dusíkatých látek v sušině hlízy kolísá vlivem genotypu a prostředí ve značném rozpětí od 34 do 70% (Bárta & Čurn, 2004).

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

V *Tab. 1* jsou uvedeny skupiny hlízových proteinů s charakteristickými vlastnostmi pro jejich skupinu mimo inhibitory proteas, jejichž podrobnější charakteristika je níže. Patatin tvoří přibližně 40 % všech bílkovin v hlíze (procento se může lišit na základě odlišnosti genotypu odrůd) (Bárta & Čurn, 2004).

*Tab. 1 Skupiny hlízových proteinů (Bárta & Bártoová, 2007)*

Skupina	Molekulová hmotnost	Aktivita enzymů	Funkce
Patatin	Monomer 40 - 43 (45) kDa	lipidacylhydrolasy (LAH aktivita)	Obranná funkce (hypotéza zatím nepotvrzena)
		cytosolové fosfolipasy A <sub>1</sub> a A <sub>2</sub> (PLA <sub>1</sub> a PLA <sub>2</sub> )	Zásobní, účast na signální transdukcii, která vyvolává obrannou reakci při napadení.

	Dimer 80 - 88kDa	$\beta$ -1,2-xylosidasy	Není zcela známa.
		kyselé $\beta$ -1,3-glukanasy (GLU-40)	Obranná funkce, antifungální aktivita.
Lektin	100 kDa v nativním stavu (50 % sacharid)		Schopnost redukovat růst některých larev.
Polynoloxidasy	60 a 69 kDa	polynoloxidasy	
Kinasa	Nad 45 kDa		
Fosforylasové isoenzymy			

## 2.2 Inhibitory proteas

Inhibitory proteas představují přibližně 20 – 30% a v odrůdě Elkana až 50% proteinů z celkového množství v bramborové šťávě (Bárta & Bártová, 2007; Pouvreau, 2004).

Inhibitory proteas tvoří v hlízách bramboru velmi rozsáhlou skupinu (až 40 % všech extrahovatelných proteinů hlíz) s vysokou mírou strukturní i funkční variability (Bártová et al., 2012). Rostlinné inhibitory proteas jsou charakterizovány jako proteiny mající schopnost inhibovat proteolytické enzymy mikroorganismů a hub, ale rostlinné proteasy (enzymy vlastní rostlině) jsou inhibovány jen výjimečně (Bárta & Bártová, 2007). Významný podíl mají také na regulaci mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti (Hraška et al., 2006).

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

Hlíza obsahuje vysoké množství těchto proteinů i bez předchozí indukce poraněním či patogenem, proto jsou považovány za zásobní látky (Bárta & Bártová, 2007; Hanusová & Čurn, 2006; Pouvreau, 2004). Ale je velmi pravděpodobné, že tento protein má i jiné fyziologické funkce (Bárta & Bártová, 2007). Některé inhibitory proteas z hlíz brambor jsou termorezistentní a zachovávají si svou aktivitu i při aplikaci vysokých teplot.

### 2.2.1 Dělení inhibitorů proteas

Inhibitory proteas jsou klasifikovány na základě typů enzymů, které inhibují. Následná klasifikace tedy vychází z kompozice aktivního místa proteas, které inhibují. Na základě tohoto principu je dělíme například jako (Bárta & Bártová, 2007; Jongsma, 1995):

- serinové (serin či histidin v aktivním místě proteasy);
- cysteinové (cystein v aktivním místě);
- aspartátové (aspartátová skupina v aktivním místě);
- metaloproteasové (s kovovým iontem v aktivním místě)

Dělení do skupin může být také komplikováno strukturou aktivního místa či homologií sekvencí (Bárta & Bártová, 2007).

Pots (1999); Bárta & Bártová (2007) dělí inhibitory proteas do tří tříd. První třídu tvoří bramborový inhibitor I (PI-1), což je inhibitor serinových proteas. Tento protein je pentamer, složený z isoinhibitorových promotorových podjednotek. Jeho celková molekulová hmotnost je 40 kDa. Představitelem druhé třídy je bramborový inhibitor II (PI-2). Tato skupina je tvořena dimery inhibitorů serinových proteas. Obě podjednotky se chovají jako jednodoménový protein. Proteiny o molekulové hmotnosti 20 až 22 kDa jsou členy třetí třídy. Tato třída se dále dělí do 4 odlišných tříd:

- inhibitory proteas Kunitzova typu,
- inhibitory cysteinových proteas,
- inhibitory aspartátových proteas
- inhibitor karboxypeptidasy.

Všechny inhibitory proteas zařazené do této třídy jsou monomery. Liší se typem proteasy, kterou inhibují, a počtem cysteinových zbytků na podjednotku (Hanusová & Čurn, 2006).

Pouvreau et al. (2001) dělí inhibitory proteas do 7 skupin. Dělení se zakládá na rozdílu molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků v molekule. Podle těchto kritérií lze rozdělit inhibitory proteas do následujících skupin (Hanusová & Čurn, 2006; Bárta & Bártová, 2007):

- inhibitor I z bramboru (PI-1),
- inhibitor II z bramboru (PI-2),
- inhibitor karboxypeptidasy z bramboru (PCI),
- inhibitor aspartátových proteas z bramboru (PAPI),
- inhibitor cysteinových proteas z bramboru (PCPI),
- inhibitor proteas Kunitzova typu z bramboru (PKPI)
- ostatní inhibitory serinových proteas (OSPI)

Nejvíce zastoupenými skupinami inhibitorů jsou PI-2 a PCPI, které představují 22 a 12% ze všech proteinů v hlíze bramboru (Hanusová & Čurn, 2006).

Navíc bylo zjištěno, že kyseliny jasmonová a arachidonová aktivují akumulaci chymotrypsinových inhibitorů (PI-1 a PI-2) (Bárta & Čurn, 2004; Valueva et al., 2001).

### **2.2.2 Bramborový inhibitor I (PI-1)**

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

### **2.2.3 Bramborový inhibitor II (PI-2)**

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

#### 2.2.4 Bramborový cysteinový inhibitor (PCPI)

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

#### 2.2.5 Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI)

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

#### 2.2.6 Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu (PKPI)

Tato skupina je jedna z nejznámějších inhibitorů proteas u brambor (Bárta & Čurn, 2004). Jsou složeny ze dvou proteinů o molekulové hmotnosti 20,2 kDa (22 kDa) (Bárta & Bártová, 2007; Bárta & Čurn, 2004). Syntetizuje se jako preproteín o molekulové hmotnosti 27 kDa. Přítomnost preproteínové formy byla nejpočetnější v poraněných listech (lokální odpověď) a dále také v neporaněných listech (systematická odpověď). S využitím protilátky proti „zralé“ formě byly v hlízové bílkovině detekovány bílkoviny v rozmezí 22–24 kDa, zatímco v listech poraněných rostlin byly detekovány bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností (27–28 kDa). Z uvedeného vyplývá, že genová exprese rodiny inhibitorů brambor o cca 22 kDa (typ Kunitz) je pod diferencovanou posttranslační kontrolou v závislosti na místě výskytu (listy, hlízy). Toto zjištění patrně potvrzuje rozdílné funkce uvedených bílkovin v listech (indukce po poranění, součást obranného mechanismu) a hlízách (zásobní bílkovina) (Bárta & Čurn, 2004; Suh et al., 1999).

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

### 2.2.7 Ostatní serinové inhibitory proteas (OSPI)

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

### 2.2.8 Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas (PCI)

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

### 2.2.9 Izolace hlízových proteinů

Hlíza bramboru obsahuje přibližně 2 % dusíkatých látek v čerstvé hmotě a z toho tvoří 34 až 70 % bílkoviny, které nejsou z hlediska výživy zanedbatelné (Bárta & Čurn, 2004). Ale hlízy neslouží jen k výživě lidí a hospodářských zvířat, jsou také nenahraditelným zdrojem pro zpracovatelský průmysl, především pro škrobářenský průmysl. Ve škrobářenském průmyslu se hlízy hodnotí podle obsahu škrobu. Zastoupení bílkovin ve vstupní surovině bylo doposud vnímáno spíše negativně, neboť bílkoviny přecházejí do vedlejších produktů (především do tzv. hlízové vody - PFJ) a způsobují problémy při konečné likvidaci tohoto odpadního materiálu (Bárta et al., 2008).

Odpadní hlízovou vodu lze v České Republice využít pouze jako dusíkato-draselné organické hnojivo, které se aplikuje v blízkosti škrobářenských provozů. I toto použití může být problematické. PFJ hnojení při rozkladu velmi zapáchá a svým zápachem obtěžuje okolí hnojených oblastí. Dalším problémem je v současné době i to, že se smí hlízová voda vyvážet na pole v důsledku platnosti „nitratové směrnice“ jen do 15.11.. Nyní se pohled na tento odpad začíná měnit. A hlízová voda již začíná být chápána jako surovina s potenciálem produkce nutričně kvalitních a obchodovatelných bílkovin (Bárta et al., 2007).



### 2.2.10 Izolace bílkovin pomocí srážení

Izolace peptidových frakcí lze provést podle metodiky v kapitole 4.2 Příprava proteinu.

Izolace hlízových bílkovin pomocí srážecích činidel - izolace bílkovin z hlízové vody brambor pomocí jejich vysrážení je z hlediska průmyslového využití perspektivní způsob, neboť v závislosti na typu použitého srážecího činidla lze tímto způsobem získat dostatečné množství nedenaturovaných bílkovin. Pro tento typ izolace hlízových bílkovin byly testovány organické i anorganické kyseliny (Koningsveld et al., 2001), jejichž účinnost z hlediska výtěžnosti izolovaných bílkovin byla nejvyšší při dosažení pH 3. Úspěšnost využití organických rozpouštědel (etanol, metanol, aceton, 2-propanol) je velmi silně závislá na režimu teplot, za kterých izolační postup probíhá. Během srážení pomocí organických rozpouštědel dochází k uvolnění tepla, což je pravděpodobně hlavním důvodem nízké výtěžnosti i zpětné rozpustnosti vysrážených bílkovin. Případné průmyslové využití těchto činidel tedy musí ve svém technologickém řešení bezpodmínečně počítat s nutností snížit teplotu reakční směsi minimálně pod 10 °C. Vysoká výtěžnost izolovaných bílkovin se zachováním zpětné rozpustnosti byla zaznamenána také při použití solí kovů (FeCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>). Při použití těchto srážecích činidel nebyla pozorována tak vysoká citlivost vůči teplotě. Výtěžnost izolačního postupu a rozpustnosti izolovaných bílkovin je velmi vysoká, zvláště pak při použití trojmocných kovů, jako to je například u FeCl<sub>3</sub> (Koningsveld 2001; Bárta & Bártová, 2008). Technologicky nevyřešeným problémem izolace hlízových bílkovin pomocí dvojmocných a trojmocných kovů je odstranění těchto iontů z výsledného bílkovinného koncentráту, což znehodnocuje jeho další využití (Bárta et al., 2007; Kristinová, 2011).

### 2.2.11 Izolace bílkovin pomocí separačních metod

#### Chromatografické metody

Chromatografie je fyzikálně chemická separační metoda selektivního dělení složek směsi založená na rozdílné rychlosti migrace rozpuštěných látek. Konkrétně jde o migraci v systému dvou fází, z nichž obvykle je jedna fáze nepohyblivá (stacionární) a jedna pohyblivá (mobilní). Chromatografické dělení nastává, uvede-li se jedna fáze do pohybu proti druhé, kde je prouděním narušována a difúzí zpětně

získávána rovnováha mezi látkami rozpuštěnými stacionární a mobilní fází chromatografickém systému (Anonym 5).

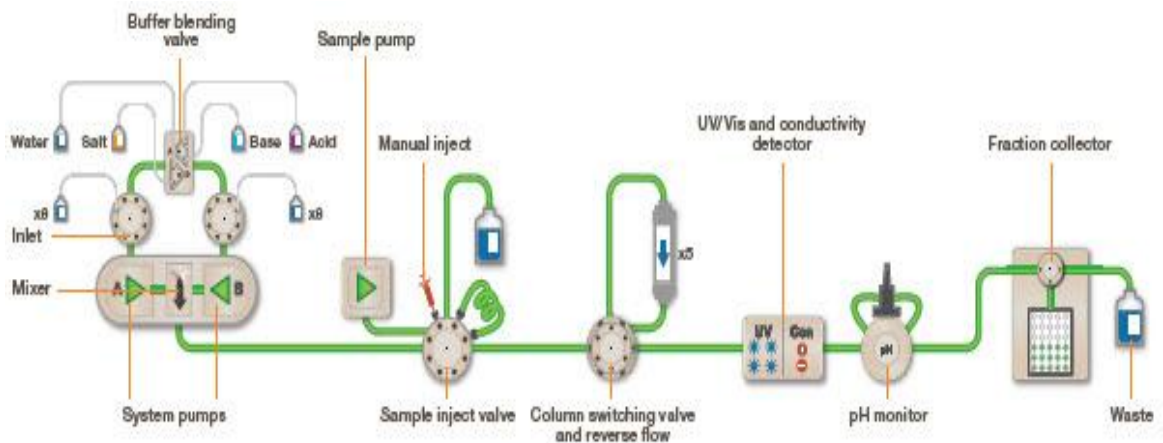
Chromatografické metody tvoří široká škála skupin metod, založených na různém principu separace. Nejčastěji se podle charakteru fází rozdělují chromatografické techniky na dvě metody a to na plynovou chromatografii a kapalinovou. Kapalinová je v systémech kapalina - kapalina nebo kapalina - pevná látka (Anonym 5). V praxi se v Nizozemí používá v průmyslové podobě obdoba adsorpční chromatografie pro získávání nativních proteinů z hlízové vody. Jinak se ostatní chromatografické metody používají spíše jen na úrovni laboratoří – vývoj a výzkum.

### ***FPLC***

Středotlaká kapalinová chromatografie (FPLC - fast protein liquid chromatography) je forma vysoce výkonné chromatografie, která využívá vysoké rozlišení, který byl umožněn malým průměrem stacionárních fází (Madadlou et al., 2011). Středotlaká chromatografie využívá čerpadlo, které řídí rychlost, kterou mobilní fáze prochází stacionární fází. Systém FPLC byl vyvinut v roce 1982, od té doby bylo vyvinuto mnoho různých systému FPLC (Anonym 4).

FPLC tekuté systémy se obvykle skládají z čerpadla, UV detektoru, měřiče vodivosti a sběrače frakcí při provozním tlaku 24 MPa. Obecné schéma průchodu mobilní fáze FPLC systémem je zobrazeno na obr. 1 (Anonym 4).

Vzorky se mohou do smyčky nanášet manuálně či automatickou injekcí. Některé systémy mají detektory pro sledování vzorku s multi-vlnovými délkami. To je vhodné zejména pro fluorescenčně značené proteiny (Anonym 4).

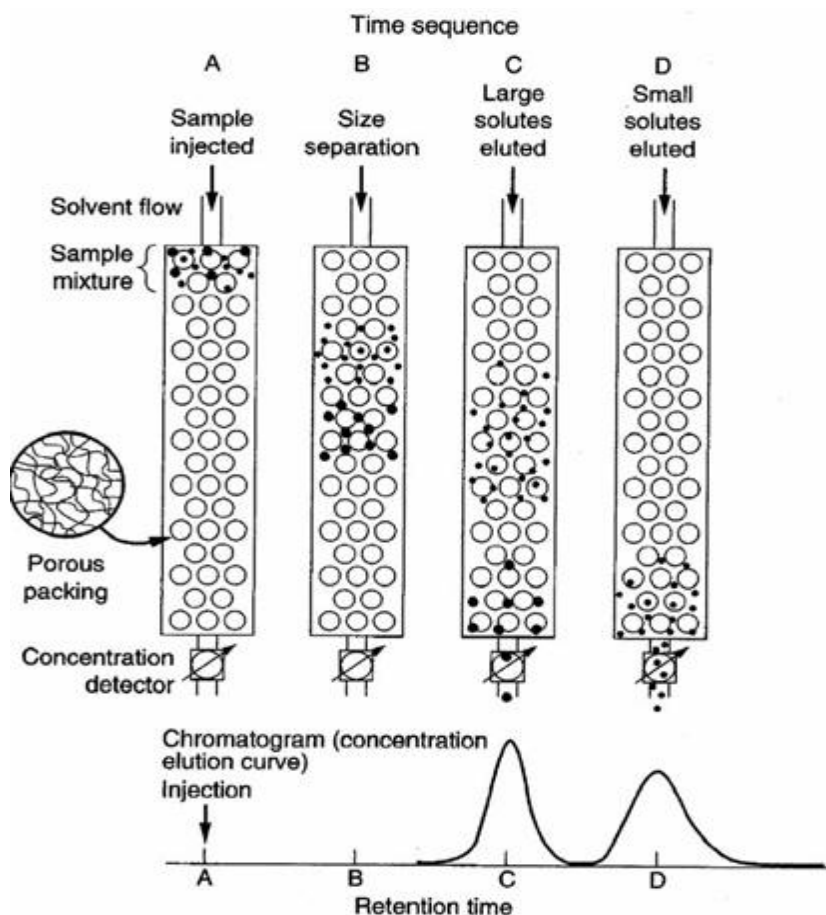


Obr. 1: Obecné schéma cesty FPLC (Anonym 4)

### „Size exclusion“ efekt

Size Exclusion Chromatography (SEC) od sebe odděluje molekuly na základě jejich velikostí filtrací přes gel. Gel se skládá ze sférických kuliček obsahujících póry o specifickém rozdělení velikostí. Malé molekuly difundují do pórů a jejich průtok kolonou je zpomalen podle jejich velikosti. Velké molekuly nemohou do pórů vstoupit a protékají kolonou rychle - vyloučeny jako první frakce. Molekuly jsou tedy eluovány v pořadí od větších molekul po molekuly s malou molekulovou hmotností viz obr. 2 (Anonym 6).

SEC je velmi výhodná k separaci molekul, lze ji dobře využít v případech, kdy jiné techniky nefungují (IEX nebo HIC). Rozlišení separace závisí na velikosti částic, velikosti pórů, průtoku, délce kolony a objemu vzorku. Obecně platí, že nejvyšší rozlišení mezi dvěma frakcemi je docíleno v kolonách s mírnými průtoky, v dlouhých, v úzkých sloupcích, s malými velikostmi částic gelu, s malými objemy vzorku ( 1 - 5 % z celkového objemu kolony) a viskozita vzorku, která je stejná jako eluentu (Anonym 6).

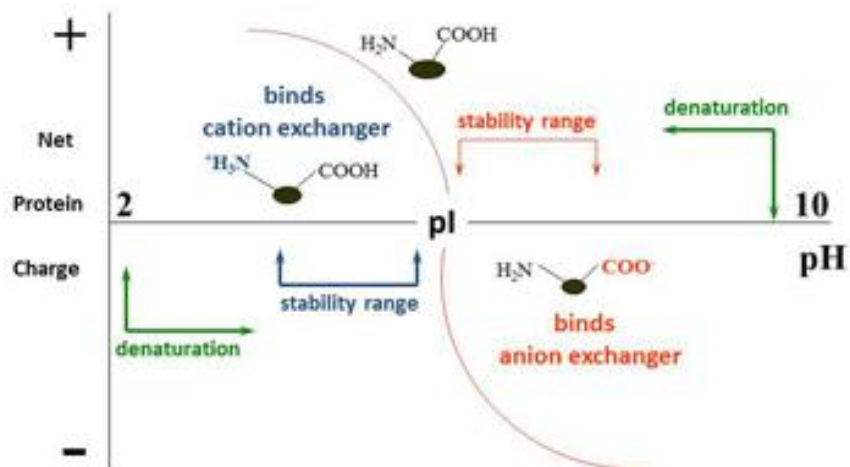


Obr. 2: Obecné schéma průběhu SEC (Anonym 7)

### Efekt iontové síly

Efekt iontové síly využívá ionto-výměnná chromatografie - separace iontů a polárních molekul na základě jejich afinity k ionexu. Lze použít k oddělení proteinu, aminokyselin nebo nukleotidů. V závislosti na pH prostředí mohou proteiny nést pozitivní náboj, čistý negativní náboj nebo žádný náboj. PH, při kterém nemá molekula žádný náboj, se nazývá izoelektrický bod nebo  $pI$ . Hodnotu  $pI$  lze vypočítat na základě primární sekvence molekuly - volba pufru (pH) určuje náboj proteinu podle schéma, které je uvedené na obr. 3. Podle náboje jsou poté frakce zachyceny na anexu či katexu a po té je lze eluovat roztokem se zvýšenou koncentrací kladně nebo záporně nabitými ionty s vyšší silou (vyšší afinitou k anexu či katexu) (Anonym 8).

Iontovou výměnnou chromatografií může být rozdělena na chromatografie na katexu, ve kterém kladně nabití ionty se váží na negativně nabitě pryskyřice a výměna aniontů chromatografie, ve které jsou vazebné ionty negativní, a imobilizované funkční skupiny jsou pozitivní. Poté, co jsou rozpuštěné látky vázány, se kolona promyje do rovnovážného stavu.



Obr. 3: Změna náboje proteinu v závislosti na pH (Anonym 8)

## 2.3 Obranné mechanismy rostlin vůči houbám

Rostliny jsou neustále vystaveny vlivům okolního prostředí a útokům patogenních organismů. Přežití za těchto podmínek vyžaduje rychlé obranné reakce, které omezují šíření patogenů po počáteční infekci, a tím dochází k omezení onemocnění (Portieles et al., 2006). Vztah mezi patogenem a hostitelem se neustále vyvíjí. V průběhu koevoluce se vyvinuly systémy, pomocí kterých může patogen účinněji napadnout hostitele a vniknout do něj, a zároveň rostliny získaly schopnost se těmto infekčním agens účinněji bránit (Heřmanová et al., 2006).

Obranné mechanismy rostlin se liší podle druhu. V následujících kapitolách bude popsána hlavně aktivní chemickou obranou (tedy syntézou obraných látek, které potlačují růst či přímo usmrcují patogenní houby) a pasivní chemickou obranou (přirozeně se vyskytující látky, které brání v růstu patogenu).

### 2.3.1 Rozdělení obranných mechanismů

Odpovědi obranného mechanismu na stres jsou dvojího typu:

- pasivní (konstitutivní)
- aktivní (rostlina na stres reaguje změnou metabolismu).

Pasivní obrana rostlin je v první řadě tvořena bariérami pletiv rostlin s různými speciálními prvky, jako jsou například vosky, které plísňe nemohou strávit a tedy ani skrz ně projít, nebo přítomnost silných materiálů jako je lignin, kůra a pokožka. Dále ji tvoří metabolity, které jsou specifické pro různé druhy rostlin (běžně se v rostlině vyskytují - není to reakce na stres jako u aktivní obrany). Mezi sekundární metabolity patří třísloviny, různé alkaloidy, fenoly a jiné látky, které působí inhibičně na patogeny (brání průniku patogenu do rostliny a přežití v rostlině). Tyto látky mají mimo pro nás sledovaného antifungálního účinku i účinek insekticidní, antimikrobiální a antibakteriální. Mimo uvedené látky mohou mít také antifungální účinek i proteiny, například inhibitory proteas (Procházka et al., 1998).

Aktivní obrana se od pasivní liší hlavně v tom, že daná obraná odpověď není před napadením patogenem k dispozici (běžně se v rostlině nevyskytuje). Při napadení patogenem je v rostlině spuštěna signální kaskáda, která vede k syntéze látek, které jsou pro daný patogen toxické. Je žádoucí, aby při této reakci bylo zabráněno průniku dalších infekčních agens. Jednou možností aktivní obrany je

hypersenzitivní reakce v oblasti napadení - nastává poškození buněk a hromadí se v nich metabolity. Takto poškozené buňky nejsou pro patogeny vhodné a zpomaluje se tak postup infekce (Procházka et al., 1998).

Jako příklad aktivní obrany lze uvést syntézu látek zvaných fytoalexiny. Jsou to nízkomolekulární látky, které se začnou syntetizovat po napadení rostliny. Fytoalexiny jsou velmi toxické pro houby i bakterie (Procházka et al., 1998).

### **2.3.2 Antifungální proteiny**

Antifungální proteiny jsou specifické stresové obranné proteiny, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. U vyšších organismů jsou tyto proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného mechanismu (Heřmanová et al., 2006). Tyto peptidy se pohybují v rozmezí 15 až 40 AMK a většina z nich jsou hydrofobní a kationtové sloučeniny, které se podílejí na přirozené imunitě (Kim et al., 2009).

Antifungální proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s dříve popsanou skupinou proteinů, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností nebo mechanismu účinku. Většina autorů se shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám proteinů PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách.

K základním pěti skupinám rostlinných antifungálních proteinů jsou dnes řazeny další skupiny – defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklofilinu, proteiny inaktivující ribozomy, proteiny přenosu lipidů a inhibitory proteas (Heřmanová et al., 2006).

Do skupiny PR proteinů mohou být zařazeny jen proteiny, jejichž syntéza je indukována přítomností patogenu (Ederva, 2005; Selitrennikoff, 2001; Heřmanová et al., 2006). V tab. 2 je přehled základních antifungálních proteinů.

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

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

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

U několika fytopatogenních hub je známo, že produkují extracelulární proteinázy. Kim et al. (2009) ve výsledcích své práce uvádí, že proteinázy hrají aktivní roli v rozvoji onemocnění. Fytopatogenní mikroorganismy produkují proteinázy, které umožňují průnik patogenu do rostliny. Jako odpověď na tuto reakci rostliny syntetizují inhibitory polypeptidů, které mohou potlačovat aktivitu těchto enzymů. Tento jev byl poprvé zaznamenán v rajčatech napadených patogenem *Phytophthora infestans*, ve kterých bylo zjištěno, že zvýšené množství inhibitorů trypsinu a chymotrypsinu koreluje s obrannou reakcí rostliny vůči patogenu. Bramborové hlízy hromadí protein o molekulové hmotnosti 20 až 24 kDa, inhibitory serinové proteinázy, jako reakce na mechanické zranění a infekcím patogenem *P. infestans* (Kim et al., 2009).

### 2.3.3 Inhibitory proteas

Inhibitory proteas jsou všudypřítomné v hlízách a v semenech rostlin a jsou obecně považovány jako zásobní proteiny a proteiny obranného mechanismu (Kim et al., 2009). A proto inhibitory proteas patří k nejčastěji se vyskytujícím antifungálním proteinům rostlin (Heřmanová et al., 2006).

Princip antifungální aktivity inhibitorů proteas není znám. Z hlediska ochrany rostlin je významná i schopnost těchto proteinů inhibovat trávicí enzymy hmyzích škůdců a to především trypsin, chymotrypsin a  $\alpha$ -amylasu. U inhibitorů proteas byla popsána bifunkčnost - inhibice trávicích enzymů i antifungální aktivita. Nejpodrobněji byla antifungální aktivita bifunkčních proteinů popsána u proteinu



zeamatinu (z kukuřice *Z. mays*). Inhibitory proteas, izolované např. z ječmene nebo pšenice, nebyly z hlediska antifungální aktivity studovány (Heřmanová et al., 2006).

Při napadení rostliny produkují patogenní organismy hydrolasy, které usnadňují pronikání patogenu do rostlinných buněk. K nejvýznamnějším hydrolasám tohoto typu patří aktivní extracelulární proteinasy, které se podílejí na degradaci pektino-proteinového komplexu buněčných stěn rostlin. Logickým obranným mechanismem rostlin je schopnost syntézy inhibitorů proteas, které aktivitu proteas snižují nebo zcela inhibují (Ryan, 1990; Bártová et al., 2012).

Ke skupině inhibitorů proteas pravděpodobně patří i skupina extracelulárních hlízových proteinů o nízké molekulové hmotnosti, které popisují Kovalskaya et al. (2009), Bártová et al. (2012). Extracelulární protein získaný z hlíz odrůdy náchylné vůči *C. michiganensis subsp. sepedonicus* obsahoval proteiny o velikosti 13, 12 a 11 kDa; u odolné odrůdy byl zaznamenán navíc výskyt proteinů o velikosti 21,5 a 19,5 kDa. Proteinový extrakt odolné odrůdy také vykazoval výrazně intenzivnější inhibiční aktivitu vůči patogenu *C. michiganensis subsp. sepedonicus* (Bártová et al., 2012).

Inhibitor karboxypeptidasy (PCI) představuje nejmenší inhibitor proteas (4,3 kDa; 39 aminokyselinových zbytků) hlíz bramboru vykazující vysokou míru termostability (Pouvreau et al., 2001; Bártová et al., 2012). U tohoto peptidu byla zjištěna silná antifungální aktivita vůči významným patogenům rýže *Fusarium verticillioides* a *Magnaporthe oryzae* a z tohoto důvodu byl gen *pci* využit pro transgenosu rýže. Rostliny syntetizující hlízový inhibitor karboxypeptidasy vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči zmíněným patogenům rýže i vůči hmyzím škůdcům *Chilo suppressalis* a *Spodoptera littoralis* (Quallis et al., 2007; Bártová et al., 2012)

### **Cysteinové inhibitory proteas**

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

### **Aspartátové inhibitory proteas**

V 90. letech minulého století byla popsána antimikrobiální a proteolytická funkce rostlinných aspartátových proteas (APs) (Guevara et al., 2001; Bártová et al., 2012). U druhu *S. tuberosum* byly identifikovány tři aspartátové proteasy, z nichž jedna byla izolována z hlíz (StAP<sub>1</sub>) a dvě z listů (StAP<sub>2</sub> a StAP<sub>3</sub>). Purifikace a charakterizace byla provedena u proteinů StAP<sub>1</sub> a StAP<sub>3</sub>, které oba mají extracelulární lokalizaci a jsou syntetizovány indukovaně v reakci na biotický i abiotický stres. Zmiňované proteiny pravděpodobně sehrávají klíčovou roli v obraně vůči *P. infestans*, neboť oba vykazují velmi silný, inhibiční účinek na klíčení zoospor *P. infestans* a konidií druhu *F. solani* (Mendieta et al., 2006; Bártová et al., 2012). Podstatou mechanismu účinku proteinů StAP je pravděpodobně jejich schopnost interakce s povrchem spor a hyf zmiňovaných patogenů a následné zvýšení permeability buněčných membrán (Guevara et al., 1999; Bártová et al., 2012). Molekulová hmotnost aspartátové proteasy izolované z listů bramboru je 40 kDa, jedná se o monomerní glykoprotein s hodnotou optimálního pH kolem 3, který je inhibován pepstatinem (Mendieta et al., 2006; Bártová et al., 2012). Vlastnosti aspartátové proteasy izolované z hlíz jsou podobné – molekulová hmotnost glykoproteinu 40 kDa, monomerní struktura, optimální pH 4,5 a inhibice pepstatinem (Stanford et al., 1989; Bártová et al., 2012).

### **Inhibitory proteas Kunitzova typu**

Inhibitory proteas Kunitzova typu patří k nejvýznamnější skupině. Jak již bylo uvedeno, při napadení hlíz patogenem *P. infestans* byla zjištěna kumulace inhibitorů Kunitzova typu s označením PSPI-21, PSPI-22, PCPI-23 a PKSI (Valueva, 1998; Bártová et al., 2012).

Inhibitor PSPI-21 je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa a vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu, chymotrypsinu a elastase. Protein PKSI je tvořen pouze jedním polypeptidovým řetězcem o velikosti 21 kDa a je aktivní vůči subtilisinu Carlsberg (Revina et al., 2008; Bártová et al., 2012). Obdobně proteiny PSPI-22 a PCPI-23 jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o hmotnosti 22 a 23 kDa (Valueva, 1998; Bártová et al., 2012). Zatímco inhibitor PSPI-22 inhibuje trypsin a chymotrypsin, PCPI-23 vykazuje aktivitu pouze vůči papainu. U inhibitorů (PSPI-21, PSPI-22 a PKSI) byl zjištěn průkazný inhibiční vliv na růst hyf a klíčení zoospor patogena *P. infestans*; inhibitory PSPI-21 a PKSI

vykazovaly *in vitro* inhibiční účinky na růst mycelia a klíčení konidií houby *Fusarium culmorum* (Revina et al., 2008; Bártová et al., 2012).

Ke skupině hlízových inhibitorů Kunitzova typu pravděpodobně náleží také protein označený jako AFP-J ( $M_r = 13,5$  kDa; inhibice trypsinu, chymotrypsinu a pepsinu), u kterého byla zjištěna silná aktivita vůči kvasinkám *C. albicans*, *Trichosporon beigeli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Antifungální aktivita nebyla u tohoto proteinu zaznamenána (Park et al., 2005; Bártová et al., 2012).

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

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

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

Geny kódující inhibitory proteas Kunitzova typu v hlízách bramboru se dělí do tří homogenních tříd s označením A, B a C. Antifungální aktivita, konkrétně vůči houbovému patogenu *Fusarium monniliforme*, byla zaznamenána u homogenní skupiny A a B (Heibges et al., 2003; Bártová et al., 2012).

### 2.3.4 Průmyslová výroba antifungálních peptidů

V poslední době se objevuje několik průmyslově vyráběných antimikrobiálních proteinů a peptidů, které inhibují růst zemědělsky významných patogenů, izolovaných z různých rostlinných zdrojů (Kim et al., 2009).

Pro průmyslovou výrobu je třeba znát přesné složení peptidů (strukturu), jeho sekvenci v DNA a správnou izolaci potřebných peptidů. Neméně důležité je znát jeho působení na patogen. Jako je mechanismus účinku potlačení houby, dávkování, vedlejší účinky a vlastní účinky (inhibice či smrt patogenu), synergické a antagonistické působení látky. Dalším aspektem, který je nutný prozkoumat jsou účinky na jednotlivé patogeny.

Vlastní antifungální peptidy mají široké použití (Bunkry et al., 2003):

- jako konzervační látky krmiv a potravin (zde je třeba širší výzkum účinků na zvířata a lidi),
- jako léčiva (pro léčbu kůže),
- jako látky zvyšující odolnost plodin a toleranci proti plísňovým patogenům
- jako mořidla sadby a osiva.

Aplikace antifungálních proteinů je možná více způsoby:

- Přímá - aplikace extrahovaného proteinů přímo na rostlinu (postřiky, moření osiva) nebo do půdy pomocí granulátů.
- Nepřímá - aplikace přípravku, který vyvolá v rostlině expresi dané sekvence a syntézu peptidů nebo lze rostlinu pomocí rekombinatních konstruktů DNA upravit na tzv. geneticky modifikovaný organismus (GMO), který bude látku syntetizovat.

## 2.4 Houby rodu *Fusarium*

### 2.4.1 Charakteristika

Rod *Fusarium* jsou vláknité houby široce rozšířené v rostlinách a půdě. Zahrnuje velké množství hub (více než 20 druhů), které mohou být patogenní pro řadu rostlin, způsobují nemoci mnoha zemědělských plodin a mohou být škodlivé pro člověka a zvířata (Anonym 1). Mnoho z nich syntetizuje celou řadu biologicky aktivních sekundárních metabolitů (např. mykotoxiny) s mimořádnou chemickou rozmanitostí. *Fusariové* mykotoxiny mohou být škodlivé jak pro rostliny, tak i pro zvířata a lidi. U lidí a zvířat jsou otravy spojeny s rakovinou a dalšími závažnými onemocněními. Otravy vznikají konzumací kontaminované potravy (Moretti, 2009).

### 2.4.2 Taxonomie

Askomycety jsou nejpočetnější všeobecně rozšířenou skupinou hub. Do této skupiny patří saprotrofové, parazité, mykorhizní houby a lichenizované houby (Sedlářová & Vašutová, 2004). Člení se na cca 40 řádů podle typu plodnic a ontogeneze plodnic. Od tohoto typu zařazení se postupně ustupuje a podle molekulárních znaků vznikají nová třídění, jako je v tab. 3 (Luginbuhl, 2010). Jednotlivé druhy rodu *Fusarium* jsou rozlišovány podle morfologie, např. tvaru makrokonidií a přítomností chlamydospór (Moretti, 2009).

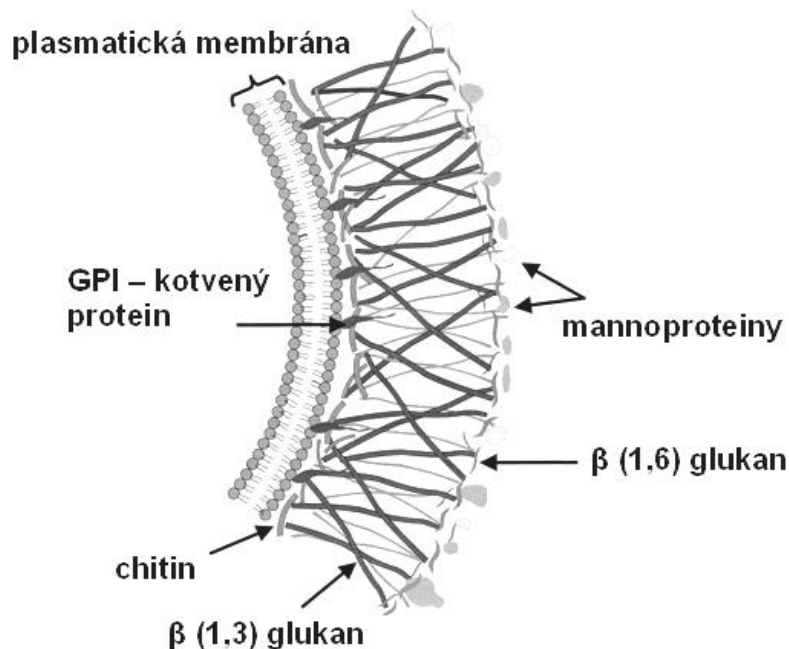
Tab.3: Taxonomie rodu *Fusarium* (Luginbuhl, 2010)

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

### 2.4.3 Rozmnožování a morfologie

Askomycety tvoří septované mycelium s jednoduchými póry. Houby tohoto rodu vytváří tři druhy spor: makrokonidie, mikrokonidie a chlamydospory, které vyrůstají na tzv. konidioforech. Septované makrokonidie mohou být produkovány na monofialidách a polyfialidách nebo také na krátkých specializovaných monofialidách tzv. sporodochia. Fialidy jsou buňky konidioforu s unikátními póry (monofialidy mají jeden pór, polyfialidy mají více pórů). Makrokonidie se velmi liší tvarem a velikostí, jsou vyráběny ve shlucích nebo řetězcích na fialidách. Chlamydospory mají velmi odolnou konstrukci se zesílenými stěnami a vysokým obsahem tuku, mohou se tvořit ve středu hyf nebo na jejich konci (Moretti, 2009).

Buněčná stěna buněk mycelia tvoří hlavně chitin a polyglukan (Sedlářová & Vašutová, 2004). Složení buněčné stěny hub je velmi rozdílné od složení stěny rostlinných buněk a této výrazné odlišnosti lze využít v aplikaci antifungálních látek, které se zaměřují pouze na buněčnou stěnu hub. Schéma typické buněčné stěny je znázorněno na obr. 4. Je důležité si uvědomit, že houby mají značný vnitřní tlak (turgor), který při sebemenším poškození buněčné stěny může vést k lýze houbové buňky (Selitrennikoff, 2001).



**Obr. 4:** Schéma stavby buněčné stěny hub (Selitrennikoff, 2001)

#### 2.4.4 Citlivost

Rod *Fusarium* je jedním z nejvíce rezistentních rodů hub. Mezi *Fusarium spp.*, má *Fusarium solani* obecně tendenci být nejodolnější ze všech (Anonym 1). Proti rodu *Fusarium* je rozšířené použití mořidel osiva, které chrání hlavně obiloviny. Antimykotika proti houbám rodu *Fusarium*, která by chránila okopaniny skoro neexistují.

Několik účinných antimikrobiálních peptidů bylo purifikováno z bramborových hlíz. Například 5-kDa pseudothionin ze *Solanum tuberosum* (PTH-St1), u něhož bylo zjištěno, že je účinný proti bakteriálním a plísňovým patogenům brambor jako je *Fusarium solani* (Kim et al., 2009).

#### 2.4.5 Mykotoxiny

Mykotoxiny, sekundární metabolity hub produkuje mnoho druhů, jako jsou například rody *Fusarium*, *Rhizoctonia* a *Gibberela*. Substráty jsou obvykle obiloviny a okopaniny. Tyto metabolity jsou jedovaté pro zvířata (i pro člověka), proto je nutné sledovat jejich výskyt v potravinách. V kontaminovaných potravinách je obvykle nacházíme v kombinaci, které často působí horší poškození než jednotlivé mykotoxiny.

Jednotlivé mykotoxiny jsou toxické v řadě směrů - vůči játrům (hepatotoxicita), ledvinám (nefrotoxicita), nervovému systému (neurotoxicita), ale řada z nich jsou i účinnými karcinomy, příp. teratogeny (tj. poškozují plod) (Kalač, 2001).

Rozlišujeme tři hlavní skupiny fusariových mykotoxinů: trichoteceny, fumonisin, zearalenon.

#### **Mykotoxiny jako kontaminanty krmiv a potravin**

Mykotoxiny neboli plísňové jedy, jsou závažné kontaminanty krmiv a potravin, vznikající při normálním nebo narušeném metabolismu některých plísní. Dnes je známo přes 300 mykotoxinů, z nichž se v potravinách a v krmivech vyskytují v hladinách, které představují zdravotní riziko, jen kolem dvaceti (Kalač, 2001).

Mykotoxiny lze nejčastěji zjistit v nedostatečně usušeném obilí a senu, v silážích ze zvadlé píče a špatně skladovaných okopaninách. Houby je obsahují především v myceliu, z něhož se vylučují do substrátu, ve kterém roste. Nelze je tedy odstranit odebráním viditelně plesnivě části krmiva či potraviny. Výskyt plísně v krmivech

ještě automaticky neznamena přítomnost mykotoxinů, avšak riziko jejich výskytu existuje. Částečným řešením je prevence růstu toxinogenních hub, zejména vytvořením anaerobního prostředí (Kalač, 2001). Mykotoxiny jsou velkým problémem kukuřičných siláží. V roce 2003 - 2005 byl monitorován obsah mykotoxinů v silážích a všechny vykazovali pozitivní výsledky. Nejvíce byl zaznamenán výskyt deoxynivalenolu, T2-toxinu a zearalenonu. Jedinou prevencí je výběr vhodných vstupních surovin a pracovních postupů. Aplikace antimykotik je v případě nálezů mykotoxinů již neefektivní, ale existují látky, které mohou mykotoxiny v trávicím traktu zvířat neutralizovat (Nedělník et al., 2006).

Pro toxické účinky mykotoxinů, tak jako toxinů obecně, je rozhodující dávka a doba působení. Akutní otravy bývají zcela výjimkou, zato chronické intoxikace jsou časté a vedou k poškození zdraví, snížení užitkovosti, případně až k úhynu (Kalač & Míka, 1997).

Důsledky působení mykotoxinů na živočišný organismus jsou velmi různorodé v závislosti na typu toxinu, dávce a délce doby jeho působení, druhu, stáří, pohlaví a aktuálním zdravotním stavu jedince. Projevují se např. snížením imunity, alergickými reakcemi, poruchami reprodukce, poruchami nervové soustavy, dýchacího ústrojí, snížením konverze a využití krmiv či zvýšenou mortalitou v chovu. Mykotoxiny také poškozují sliznici střev, čímž omezují absorpci živin a dále zhoršují funkci jater, ledvin, reprodukčních orgánů a imunitního systému. Gastrointestinální absorpci dochází k pronikání toxinů do krevního řečiště a do tělesných tkání. Poté, co jsou mykotoxiny zkonsumovány a absorbovány v zažívacím traktu, dostávají se do jater, kde dochází k jejich biologické transformaci. Za normálních okolností taková biotransformace toxicitu škodlivých látek snižuje. V případě mykotoxinů však někdy dochází paradoxně k jejímu zvýšení a zlepšení schopnosti těchto látek pronikat do jedlých tělesných tkání. V porovnání s monogastry jsou přežvýkavci vůči některým mykotoxinům odolnější, protože jejich bachorová mikroflora tyto látky rozkládá a likviduje. Bachorové mikroorganismy jsou schopny některé mykotoxiny transformovat, např. transformace aflatoxinů řady B na M typ (Bertuzzi et al., 2003, Gimeno & Martins, 2002). Nejčastější dopad kontaminace krmiva mykotoxiny na živočišnou produkci je však subklinický. Prvotní dopad mykotoxinů na zdraví zvířat i lidí je imunosuprese a snížení efektivity řady metabolických procesů a tedy zvýšená citlivost k negativním faktorům prostředí



(Danicke, 2001). Mykotoxiny mohou vést k akutní intoxikaci, ale především mohou narušit užítkovost zvířete tím, že snižují jejich hmotnostní přírůstek, konverzi krmiva a odolnost proti infekčním nemocem (Nedělník et al., 2006).

Mykotoxiny u zvířat způsobují pokles užítkovosti, plodnosti, odolnosti vůči infekcím a parazitům. Při větším požití vyvolávají onemocnění mykotoxikózy. O jejich toxicitě svědčí mimořádně nízké přípustné limity v krmivech, které se pro jednotlivé druhy a kategorie hospodářských zvířat pohybují v jednotkách až desítkách  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , avšak pro některé citlivé druhy např. pstruhy jen do  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Kalač, 2001).

Velmi nepříznivá je skutečnost, že část mykotoxinů přechází z krmiva do mléka. Dalším problémem je jejich stálost při značně vysokých teplotách a v kyselém prostředí. Běžné úpravy potravin a krmiv proto nemohou přítomné mykotoxiny odstranit (Kalač, 2001).

### **Trichoteceny**

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

Vomitoxin může vyvolávat rakoviny jícnu. Toxin T-2 v pivovarském mlátu vyvolával záněty trávicího ústrojí a krvácení u dojnic, nikoliv však u telat a selat (Kalač & Míka, 1997).

Obsah vomitoxinu se podle údajů z Evropy pohybuje kolem  $1 \text{ mg}/\text{kg}$ , v USA až  $50 \text{ mg}/\text{kg}$ . Nejvyšší tolerovaný obsah v krmné dávce podle doporučení evropské unie činní při dlouhodobém krmení prasat  $0,2 \text{ mg}/\text{kg}$  krmiva, výkrmu prasat  $0,6 \text{ mg}/\text{kg}$ ,

chovných prasat 1,0 mg/kg. Pro kuřice je to 2 mg/kg, pro nosnice 5 mg/kg, u přežvýkavců rovněž 5 mg/kg. Pokud spolu působí více mykotoxinů najednou, je třeba počítat s nižší dávkou (Kalač & Míka, 1997).

### **Fumonisin**

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

### **Zearalenony**

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

Hodnoty  $LD_{50}$  pro různá zvířata jsou velmi vysoké (2 - 10g/kg). U pohlavně nevypělých prasniček vykazuje výrazný hyperestrogení účinek. Škodlivost zearalenonu je vyšší u mladých zvířat než u starších. Drůbež je méně citlivá než prasata. Krmiva s obsahem pod 0,03 mg/kg nevyvolávala u brojlerů žádný negativní účinek. Při desetinásobně vyšším obsahu se už u krůt a kuřiček objevovali patologické změny na řitním otvoru, kloace a vejcovodu. Dospělé nosnice nevykazovaly žádné příznaky ani při 0,6 mg/kg. Zkrmování fusariózní kukuřice se výskytem zearalenonu narušovalo spermiogenezi u houserů. Příznaky se dostávají už zpravidla při 1 mg zearalenonu na kg krmiva. Jakmile se takové krmivo vyřadí z krmné dávky, tak příznaky mizí (Kalač & Míka, 1997).

Toxicita zearalenonu u skotu je silnější než u drůbeže, ale slabší než u prasat. U samic v prepubertálním období se jedincům zvětšuje mléčná žláza, toxin má silný uterotrofní efekt (otoky dělohy a zevních pohlavních orgánů) a vyvolává atrofii vaječnicků. U samců se prodlužují prsní bradavky a varlata zakrňují. Svého času se  $\alpha$ -zearalenon, což je derivát hydroxyderivát zearalenonu, používal jako anabolikum u skotu (Kalač & Míka, 1997).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny zařadila zearalenon do kategorie „omezeně karcinogenních látek“ (Kalač & Míka, 1997).

### **Fusariny**

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

### **Moniliformin**

Produkují ho druhy jako jsou *F. oxysporum* a *F. culmorum*. Vyvolává poruchy intercelulární osmotické regulace a otoky srdečního svalu. Vyskytoval se velice často v oblastech, kde lidé trpěli častější rakovinou jícnu (Kalač & Míka, 1997).

## **2.4.6 *Fusarium solani***

Druh *F. solani* je celosvětově rozšířený v půdě, v rostlinách i u živočichů. Je to hlavně patogen rostlin, ale může napadat i lidi, u kterých způsobuje keratitidu. Je to producent fusarové kyseliny. Významný kontaminant skladovaných potravin způsobuje skladové hniloby (suchá hniloba bramborových hlíz).

### **Makroskopické znaky**

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

### **Mikroskopické znaky**

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

### **Patogenita**

*Fusarium solani* zahrnuje různorodé a široké spektrum hostitelů jako jsou například *Cucurbita spp.*, luštěniny (hniloba kořenu a stonku hrachu, syndrom náhlého úmrtí sóji) a *Solanum tuberosum* (suchá hniloba hlíz). Některé kmeny mohou způsobovat infekci i u lidí (Luginbuhl, 2010).

### 2.4.7 *Fusarium oxysporum*

Je celosvětově rozšířená houba. Některé podruhy jsou saprofyty a jiné ryze parazitické, které jsou původci některých rostlinných chorob. Kolonie jsou rychle rostoucí, 4,5 cm do 4 dnů.

#### **Makroskopické znaky**

Makroskopická morfologie se může výrazně lišit v různých médiích. Na PDA půdě má rychlý růst. Kolonie jsou zpočátku bílé, ale ve stáří se zbarvují fialově až oranžově (Sutton et al., 1998). Mycelium je pravidelné a uspořádané do hustě rozvětvených uskupení (Anonym 2).

#### **Mikroskopické znaky**

Hyfy jsou přepaženy a hyalinní. Konidiofory jsou krátké a jednoduché. Makrokonidie jsou hojné, srpovité a tenkostěnné buňky. Jsou tři až pěti přepažené měřící 23 - 54 x 3 - 4,5  $\mu\text{m}$  (Sutton et al., 1998). Vyskytují se běžně na povrchu rostlin usmrčených touto houbou (Anonym 3). Mikrokonidie jsou většinou nepřepažené, elipsoidní až válcovité, nepatrně zakřivené nebo rovné, 5 - 12 x 2,3 - 3,5  $\mu\text{m}$  velké, vyskytující se na krátkých monofialidách (Sutton et al., 1998). Houba je produkuje za všech okolností, proto jsou to nejčastěji se vyskytující asexuální spory. Vznikají v cévách infikovaných rostlin (Anonym 3). Chlamydo-spory jsou přítomné a často hojné, vyskytující se jednotlivě a ve dvojicích. (Sutton et al., 1998; Anonym 2). Vznikají ve starším myceliu. V půdě mohou přetrvat až 30 let (Anonym 3).

#### **Patogenita**

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

Spory se mohou šířit na kratší vzdálenosti například závlahovou vodou, znečištěnými zemědělskými stroji. Na dlouhé vzdálenosti je lze přenést na kontaminovaných sazenicích, semen či je může přenášet vítr (Argrios, 1988).

Mezi zatím nejlepší opatření patří dekontaminace půdy a rozmnožovacího materiálu zeleniny s fungicidy, střídání plodin a používání odolných odrůd (Argrios, 1988).

#### **2.4.8 *Fusarium graminearum***

Je významný patogen obilných zrn známý také pod názvem *Gibberella zae*. Má významné ekonomické dopady v zemědělském průmyslu. Odhaduje se, že 50 % ztrát na obilí je způsobeno právě tímto patogenem (Gilchrist & Dubin, 2002).

##### **Mikroskopické znaky**

*Fusarium graminearum* mají výrazný makrokonidie ve tvaru banánu. Tyto konidia obsahují septa. Jakmile jsou podmínky příznivé, tato konidia produkují askospory na podporu jejich rozptýlení (Goswami, 2004).

##### **Patogenita**

Tento patogen napadá různé zrniny (kukuřice, rýže, pšenice, oves) a způsobuje strupovitost. Produkuje mykotoxiny deoxynivalenoly (DON) a zearalenony (Marasas et al., 1984). DON může snížit příjem krmiv prasaty. Při vysokých koncentracích vyvolává zvracení, problémy s plodností a otékání vulvy (Trenholm et al., 1984).

Pro člověka jsou mykotoxiny produkované tímto patogenem nebezpečné hlavně pro játra.

#### **2.4.9 *Fusarium culmorum***

Je to významný patogen obilovin, který se vyskytuje na celém světě.

##### **Makroskopické znaky**

Kolonie dobře rostou na bramborovo-dextrózovém agaru (PDA). Mycelium je bělavé až žluté, ve stáří hnědne.

##### **Mikroskopické znaky**

Mikrokonidie chybí, ale makrokonidie jsou časté. Jsou hnědé barvy. Tvar mají na hřbetu zakřivený, ale ventrální strana je rovná. Velikost se pohybuje od 5 do 7 um na šířku a dlouhé jsou 30 až 50 um. Chlamydiospory se tvoří celkem hojně a poměrně rychle. Jsou silnostěné a mají kulovitý tvar a lze je najít jednotlivě, ve

shlucích nebo v řetízcích. Velikost se pohybuje v rozmezí 9 až 14 um (Scherm et al., 2013).

### Patogenita

*Fusarium culmorum* způsobuje hnilobu kořenů a klasů obilovin. Napadá především obiloviny, ale také okopaniny a jiné rostliny. Produkuje mykotoxiny deoxynivalenoly, nivalenoyl a zearalenony, které se mohou objevit v zrnech a ohrožovat tak zdraví zvířat a lidí (Wagacha & Muthomi, 2007).

## 2.5 *Rhizoctonia solani*

Je to patogenní houba se širokým hostitelským rozsahem a téměř kosmopolitním výskytem. Taxonomie rodu *Rhizoctonia* je uvedena v tab. 4.

Tab. 4: Taxonomie rodu *Rhizoctonia*

Říše	Houby
Kmen	<i>Basidiomycota</i>
Třída	<i>Agaricomycetes</i>
Řád	<i>Cantharellales</i>
Čeleď	<i>Ceratobasidiaceae</i>
Rod	<i>Rhizoctonia</i>

### Makroskopické znaky

Kolonie mají bílou až hnědou barvu. Roste v chomáčcích.

### Mikroskopické znaky

Nepohlavní spory neprodukuje. Na infikovaných rostlinách je možné spatřit sexuální výtrusy, takzvaná basidia. Na každém jsou 4 spory. Hyfy jsou 4 - 15 um široké a často se dělí v pravém úhlu (Wiese, 1987).

### Patogenita

*Rhizoctonia solani* napadá hlízy a podzemní stonky brambor. Hospodářsky významné škody způsobuje jen ve vlhkých a chladných půdách. Napadá vojtěšku, arašíd, sóju, fazole a další.

Na povrchu hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) tvoří černé strupy. Takto poškozená hlíza lze po oloupání slupky dále konzumovat, ale již nejsou vhodné jako osivo. Později se mohou začít objevovat plísňové léze a rakovina hlízy. Ničí výhonky a nakonec rostlinu usmrtí. Kontaminuje půdu, kontaminaci může snížit střídání plodin (Anonym 4).

### **3 Cíle diplomové práce**

Cíle diplomové práce byly následující:

- Získání termorezistentní frakce inhibitorů proteas ze tří odrůd bramboru hlíznatého
- Otestovat jejich antifungální působení vůči vybraným hospodářsky významným mikroskopickým houbám



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Houby

Pro experiment byly vybrány patogenní mikroskopické houby uvedené v tab. 5.

Tab. 5: Kmeny z České sbírky mikroorganismů použité v práci

Druh	Označení kmene v České sbírce mikroorganismů	Označení hub v experimentu
<i>Fusarium graminearum</i>	F-683	A
<i>Fusarium solani</i>	8014	B
<i>Fusarium oxysporum</i>	17	C
<i>Fusarium oxysporum</i>	F65	D
<i>Rhizoctonia solani</i>	F-1	E
<i>Fusarium solani</i>	8079	F
<i>Fusarium culmorum</i>	F-163	G

#### 4.1.2 Hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.)

V této práci byly použity odrůdy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) Eurostrach, Adéla a Ornella. Hlízy těchto odrůd byly vypěstovány na pozemcích Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2013. Byly skladovány v chladu (4°C) a temnu při 95% relativní vlhkosti vzduch.

Odrůda Adéla je raná konzumní odrůda. Má vysokou odolnost proti virovým chorobám a plísní bramborové. Dosahuje vysokého výnosu oválných hlíz se sytě žlutou dužninou. Hlízy jsou odolné mechanickému poškození a obecné strupovitosti.

Odrůda Eurostarch je polopozdní až pozdní průmyslová odrůda, která je určena pro škrobářské zpracování. Je vysoce odolná proti hád'átkům, terčové a hnědé skvrnitosti brambor.

Ornella je polopozdní průmyslová odrůda, která je odolná vůči rakovině brambor. Má středně rychlý počáteční růst natě, s vyšší odolností proti virovým chorobám a plísní bramborové. Nárůst hlíz je pomalý, velikost hlíz je střední s vyšším počtem hlíz pod trsem. Hlízy mají vyšší odolnost obecné strupovitosti a

mechanickému poškození. Odrůda dosahuje středního výnosu hlíz s vysokou škrobnatostí. Je vhodná jako surovina pro výrobu lupínků a pro zpracování na škrob.

## 4.2 Příprava proteinu

Hlízy bramboru se očistí pod tekoucí vodou a odšťavní pomocí domácího odšťavňovače. Získaná bramborová šťáva (PFJ – potato fruit juice) se centrifuguje (4500 ot./min po dobu 10 minut při teplotě 4°C). Supernatant se převede do kádinky a filtruje se na běžném papírovém filtru K1 (ThermoFisher, CZ). U přefiltrované hlízové šťávy se provede úprava reakce na pH 5 pomocí 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

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

Lyofilizovaný termorezistentní protein izolovaný pomocí zahřátí na 80°C (TRP-80) se převede na 30% roztok přidáním deionizované vody. Roztok se převede do dialyzačního potrubí (MWCO 3 kDa) a vložíme do kádinky s vychlazenou deionizovanou vodou o objemu 1800ml. Dialýza probíhá po dobu 24 hodin, kdy se v průběhu dialýzy mění deionizovaná voda (4x po přibližně stejných časových úsecích). Dialyzuje se 2x. Roztok se opět zakoncentruje pomocí lyofilizátoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Německo) při stejných podmínkách. Získaná sušina se skladuje v hermeticky uzavřených dózách v suchu při teplotě -20°C do použití.

Orientační výtěžek izolace TRP-80 se získá vážením lyofilizovaného proteinu mezi jednotlivými kroky. Z tab. 6 je patrné, že nejvíce proteinu z 1000 ml PFJ lze získat z odrůdy Eurostarch a nejméně z odrůdy Adéla. Rozdíly ve výtěžnosti mezi jednotlivými vzorky jsou minimální.

Tab. 6: Výtěžek izolace proteinu před a po dialýze z 1000 ml PFJ

Odrůda bramboru	Výtěžek před dialýzou	Výtěžek po dialýze
Adéla	48,925 g	2,175 g
Eurostarch	46,175 g	2,917 g
Ornella	32,690 g	2,300 g

#### 4.2.1 Kvantifikace proteinu pomocí spektrofotometrie

Kvantifikace proteinu se provede ze vzorku TRP-80 o koncentraci 10 mg vzorku/1 ml deionizované vody pomocí Pierce BCA Protein Assay Kit. BCA metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA), která komplexuje ionty Cu (I) tvořené reakcí peptidové vazby s Cu (II). Činidlo se připravuje smísením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí (100 dílů) a  $CuSO_4$  (1 díl).

Kalibrace na standardy se provádí BSA - hovězí sérový albumin. Příprava standardů se provede podle tab. 7. První tři ředění BSA provedeme pomocí 1 ml ampule 2 mg/ml albuminu (Albumin Standard).

Tab. 7: Příprava BSA standardů (pracovní rozsah 20 -2000  $\mu\text{g/ml}$ )

Tuba	Objem ředidla	Objem a zdroj BSA	Konečná koncentrace BSA
A	0 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$ z Albumin Standard	2000 $\mu\text{g/ml}$
B	125 $\mu\text{l}$	375 $\mu\text{l}$ z Albumin Standard	1500 $\mu\text{g/ml}$
C	325 $\mu\text{l}$	325 $\mu\text{l}$ z Albumin Standard	1000 $\mu\text{g/ml}$
D	175 $\mu\text{l}$	175 $\mu\text{l}$ z tuby B	750 $\mu\text{g/ml}$
E	325 $\mu\text{l}$	325 $\mu\text{l}$ z tuby C	500 $\mu\text{g/ml}$
F	325 $\mu\text{l}$	325 $\mu\text{l}$ z tuby E	250 $\mu\text{g/ml}$
G	325 $\mu\text{l}$	325 $\mu\text{l}$ z tuby F	125 $\mu\text{g/ml}$
H	400 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$ z tuby G	25 $\mu\text{g/ml}$
I	400 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$	0 = Blank

Připraví se pracovní reakční směs BCA (WR) smícháním 50 dílů BCA činidla A s 1 dílem BCA činidla B.

Do zkumavky se napipetuje od každého standardu a vzorku 0,1 ml, přidá se 2 ml WR do každé zkumavky a inkubuje se při 37°C po dobu 30 minut. Měří se na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm, pomocí standardů se připraví korelační křivka. A pomocí ní se vypočte koncentrace proteinu ve vzorku.

### 4.3 Příprava kultivačního média

ISA je částečně definované médium určené pro testy antimikrobiální citlivosti. Složení použitého média je uvedeno v tab. 8.

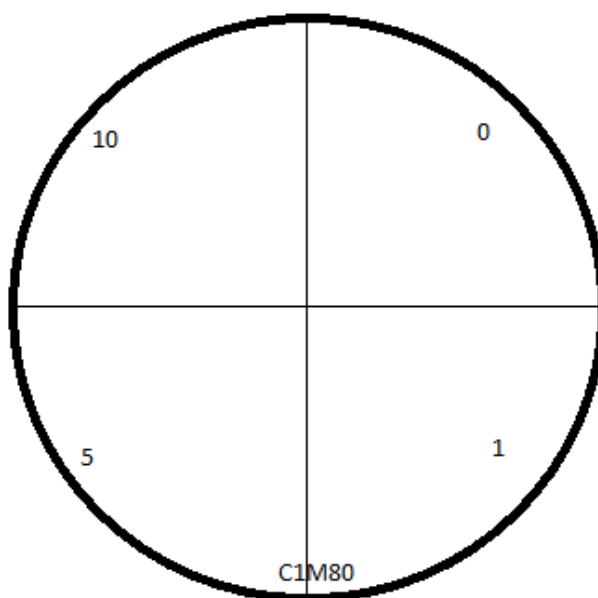
Tab. 8: Složení Oxoid ISA CM0471

<b>Typická Formule</b>	<b>g / l</b>
Hydrolyzovaný kasein	11,0
Peptony	3,0
Glukóza	2,0
Chlorid sodný	3,0
Rozpustný škrob	1,0
Hydrogenfosforečnan sodný	2,0
Octan sodný	1,0
Hořčík glycerofosfát	0,2
Glukonát vápenatý	0,1
Síran kobaltnatý	0,001
Síran měďnatý	0,001
Síran zinečnatý	0,001
Síran železnatý	0,001
Chlorid manganatý	0,002
Menadione	0,001
Kyanokobalamin	0,001
L-cystein hydrochlorid	0,02
L-tryptofan	0,02
Pyridoxin	0,003
Pantothénát	0,003
Nikotinamid	0,003
Biotin	0,0003
Thiamin	0,00004
Adenin	0,01
Guanin	0,01
Xantin	0,01
Uracil	0,01
Agar	8,0
Celkem	31,4

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

#### 4.4 Testy antifungální citlivosti

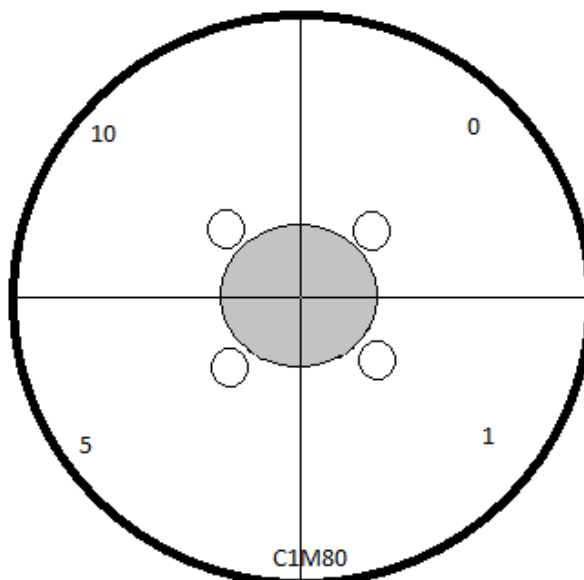
Očkování mikroskopických hub se provádí na ISA agaru v Petriho miskách ve sterilním prostředí (flow box). Petriho misku je před samotným očkováním třeba opatřit křížem (ze spodu), který nám určí střed, na který se bude očkovat houba. Každá vzniklá čtvrtina se označí koncentrací proteinu, který se bude později aplikovat (koncentrace 10mg/mm, 5mg/mm, 1mg/mm a 0mg/mm). Dále se musí Petriho miska náležitě označit zkratkou očkované houby, číslem opakování (1 až 5) a zkratkou odrůdy bramboru, ze které byl získán TRP-80, který se bude později aplikovat. Sterilizovaným korkovrtem se vyřízne v agaru porostlém houbovou kulturou kruhová výseč, která se za pomoci sterilního skalpelu přeneso na střed kříže označené Petriho misky s ISA. Naočkované Petriho misky se vloží do thermoboxu a kultivují se při teplotě 25°C 48 - 36 hodin (liši se podle druhu houby).



Obr. 5: Schéma značení Petriho misky

Protein se aplikuje v ředění 10mg/mm, 5mg/mm, 1mg/mm a 0mg/mm (deionizovaná voda). Na analytické váze se naváží 100mg TRP-80 do zkumavky, přidá se 10ml deionizované vody a promíchá se. Centrifuguje se při teplotě 4°C po dobu 10 minut (tvorba homogenního roztoku). Převéde se přes mikrobiální filtr o velikosti síta 0,22 $\mu$ m. Připraví se mikrozkušavky (ependorftube) pro ředění 10mg/mm 5mg/mm, 1mg/mm, 0mg/mm (deionizovaná voda) a do použití se uschovají v chladu a temnu. Zbytek roztoku se zamrazí na teplotu -20°C a uschová pro pozdější použití.

Po 48 - 36 hodinách (liší se podle druhu houby) kultivace naočkovaných Petriho misek houbou se ve sterilním prostředí (flow box) provede aplikace příslušných ředění do kruhových jamek. Kruhová výseč se udělá sterilním korkovrtem 1mm od okraje houbové kultury v každé čtvrtině vzniklé křížem (ve středu čtvrtiny) a kruhovou výseč vyjmeme sterilním skalpelem. Do těchto vzniklých jamek se pipetou přenese postupně do první čtvrtiny 30 $\mu$ l deionizované vody, do druhé čtvrtiny 30 $\mu$ l roztoku TRP-80 s ředěním 1mg/mm, do třetí čtvrtiny 30 $\mu$ l roztoku TRP-80 s ředěním 5mg/mm a do čtvrté čtvrtiny 30 $\mu$ l roztoku TRP-80 s ředěním 10mg/mm. Petriho misky se přemístí do thermoboxu (opatrně, aby se nerozlil protein) a kultivují se 24 hodin při teplotě 25°C.



*Obr. 6: Schéma aplikace proteinu*

Po 24 hodinách se Petriho misky převedou do digitalizované formy pomocí fotoaparátu. Po focení se Petriho misky uloží do thermoboxu (kultivace při 25°C). Po 48 hodinách následuje druhé focení a vyhodnocování velikosti inhibičních zón.

## 5 Výsledky

### 5.1 Koncentrace proteinu

V tab. 9 je uvedena koncentrace vzorku TRP-80 zjištěna BCA metodou při ředění 10 mg/ml. Z tabulky je patrné, že nejnižší koncentraci proteinu má odrůda Ornella před úpravou tepelnou koagulací. Naopak protein izolovaný z odrůdy Ornella, který touto úpravou prošel, má naměřenou koncentraci nejvyšší.

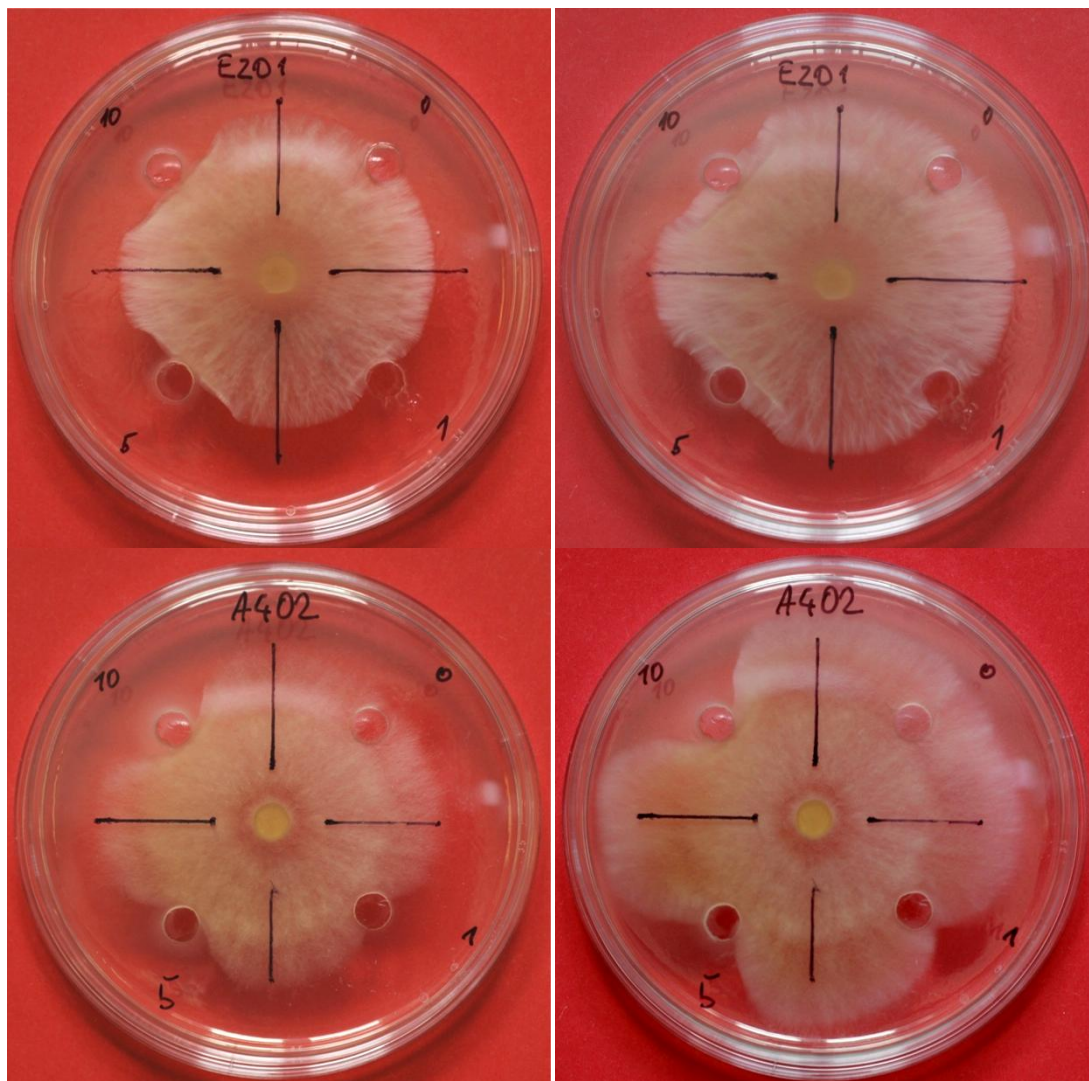
Tab. 9: Koncentrace vzorku TRP-80

Odrůda	Koncentrace
Adéla	7,75055 mg/ml
Eurostarch	7,75475 mg/ml
Ornella po tepelné koagulaci	7,76495 mg/ml
Ornella před tepelnou koagulací	7,74625 mg/ml

### 5.2 Vyhodnocení plochy inhibice radiálního růstu

Hodnocení bylo provedeno na šesti kmenech rodu *Fusarium* a na jednom kmeni rodu *Rhizoctonia* v pěti opakováních focených po 24 a po 48 hodinách. Vyhodnocení bylo provedeno v programu AutoCad 2013 (trial verze). Na obr. 7 jsou dobře patrné zóny inhibice radiálního růstu.





Obr. 7: Digitální fotografie Petriho misek. Vlevo po 24 hodinách kultivace po aplikaci TRP-80. Vpravo po 48 hodinách kultivace. V misce nahoře je naočkována houba *Rhizoctonia solani* F-1 proti níž byl aplikován TRP-80 z odrůdy Adéla. V misce dole je naočkována houba *Fusarium graminearum* F-683 proti níž byl aplikován TRP-80 z odrůdy Eurostarch.

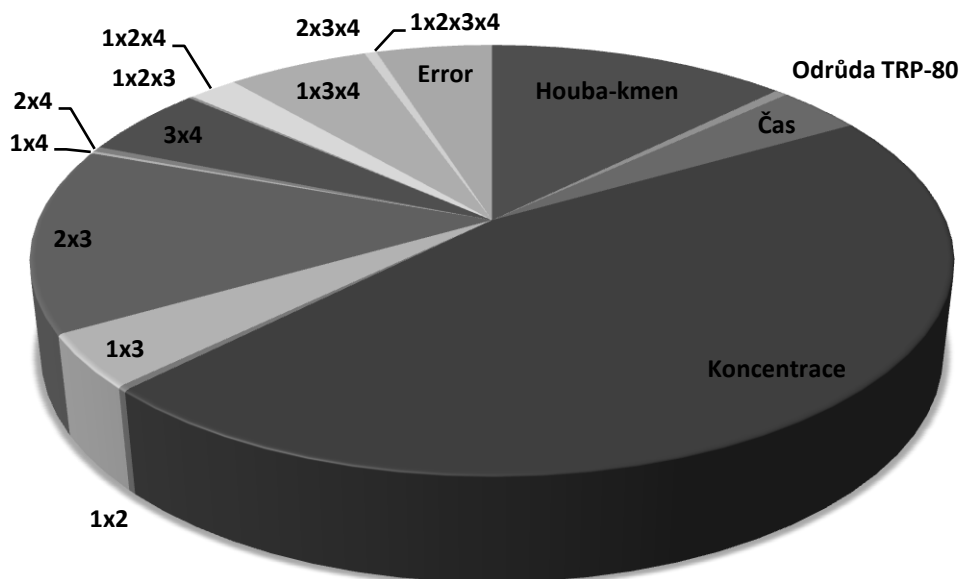
Získané hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica 9 (trial verze). V příloze 1 je soubor dat, ze kterého byly zpracovávány následující data. V tab. 10 je výstup analýzy rozptylu. Všechny sledované faktory vykázaly přímý vliv na velikost plochy inhibice růstu (PIR), mimo dvou faktorů a to faktor 1 x 2 x 3 a faktoru 1 x 2 x 3 x 4, které nebyly statisticky významné

Tab. 10: Analýza rozptylu (ANOVA) vícefaktorová (Statistica 9). SS = součet čtverců (Sum of Squares), Degr. of. = stupeň volnosti (Degree of Freedom), MS = průměr čtverců (Mean Square), F = testové kritérium, p = p-hodnota

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	273,7632	1	273,7632	9564,520	0,000000
<b>Houba-kmen (1)</b>	<b>80,2954</b>	<b>6</b>	<b>13,3826</b>	<b>467,549</b>	<b>0,000000</b>
<b>Odrůda TRP-80 (2)</b>	<b>2,6439</b>	<b>2</b>	<b>1,3219</b>	<b>46,185</b>	<b>0,000000</b>
<b>Čas (3)</b>	<b>13,9480</b>	<b>1</b>	<b>13,9480</b>	<b>487,304</b>	<b>0,000000</b>
<b>Koncentrace (4)</b>	<b>184,1308</b>	<b>3</b>	<b>61,3769</b>	<b>2144,338</b>	<b>0,000000</b>
1 x 2	2,7985	12	0,2332	8,148	0,000000
1 x 3	11,7013	6	1,9502	68,135	0,000000
2 x 3	0,5478	2	0,2739	9,569	0,000080
1 x 4	55,6988	18	3,0944	108,109	0,000000
2 x 4	2,3357	6	0,3893	13,601	0,000000
3 x 4	11,4832	3	3,8277	133,731	0,000000
1 x 2 x 3	0,5633	12	0,0469	1,640	0,076347
1 x 2 x 4	5,3874	36	0,1497	5,228	0,000000
1 x 3 x 4	9,8427	18	0,5468	19,104	0,000000
2 x 3 x 4	0,7319	6	0,1220	4,262	0,000319
1 x 2 x 3 x 4	1,0696	36	0,0297	1,038	0,410083
Chyba	18,8624	659	0,0286		

Na obr. 8 je zobrazen procentuální podíl jednotlivých faktorů a interakcí na celkové variabilitě hodnot plochy inhibice radiálního růstu. Největší vliv na velikost plochy inhibice radiálního růstu měla koncentrace aplikovaného proteinu (45,7 %).

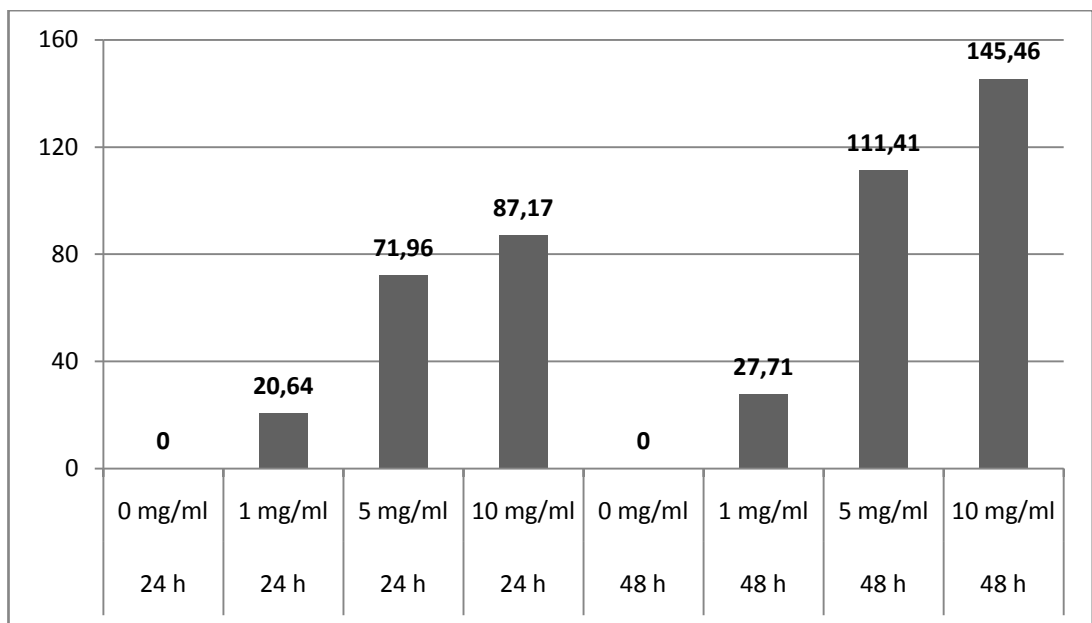
Houbová odrůda a kmen měly výrazný vliv na celý experiment, ovlivňovaly velikost plochy inhibice radiálního růstu z 12,5 %. Malý vliv na plochu měla odrůda bramboru 0,5 % a čas 3,6 %. Plochu inhibice radiálního růstu velmi ovlivňuje interakce mezi odrůdou TRP-80 a časem (13,9 %). Další interakce mající vliv na plochu inhibice radiálního růstu houbových kultur jsou houba - kmen x čas x koncentrace (5,9 %), čas x koncentrace (5,4 %), houba - kmen x čas (4 %). Chyba zde zastupuje 4,8 %.



Obr. 8: Procentuální podíl faktorů interakcí na celkové variabilitě hodnot plochy inhibice radiálního růstu.

### 5.2.1 Hodnocení vlivu koncentrace

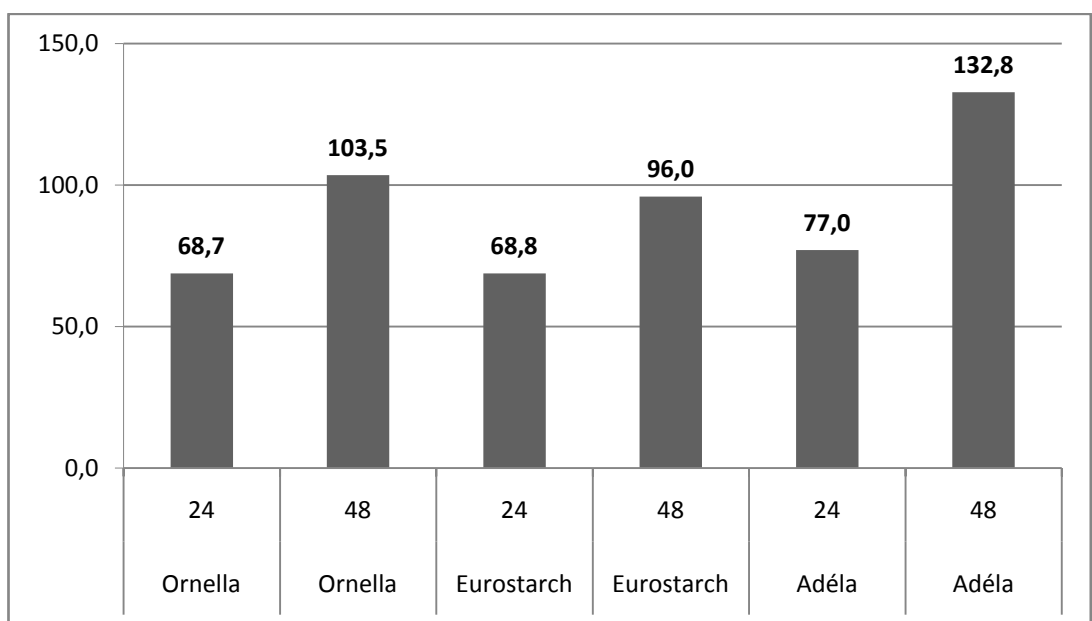
Koncentrace měla podle očekávání největší vliv na celý experiment. Byly hodnoceny čtyři koncentrace a to koncentrace 0 mg/ml (kontrola), 1 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml. Průměrné naměřené hodnoty PIR u koncentrací jsou uvedeny na obr. 9. Kontrola tedy koncentrace 0 mg/ml byla vždy nulová. Rozdíl mezi koncentracemi 1 mg/ml a 5 mg/ml byl velmi výrazný. Mezi koncentracemi 5 mg/ml a 10 mg/ml již nebyl tak významný rozdíl. Čím byla koncentrace vyšší, tím větší růst PIR vykazovala v čase. Protože měla koncentrace tak výrazný vliv na velikost PIR byla v následujících hodnocení vyřazena, aby lépe vynikly i další faktory ovlivňující velikost PIR. V dalších hodnoceních je zpracována pouze koncentrace 5 mg/ml.



Obr. 9: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na koncentraci a času.

### 5.2.2 Hodnocení vlivu odrůdy

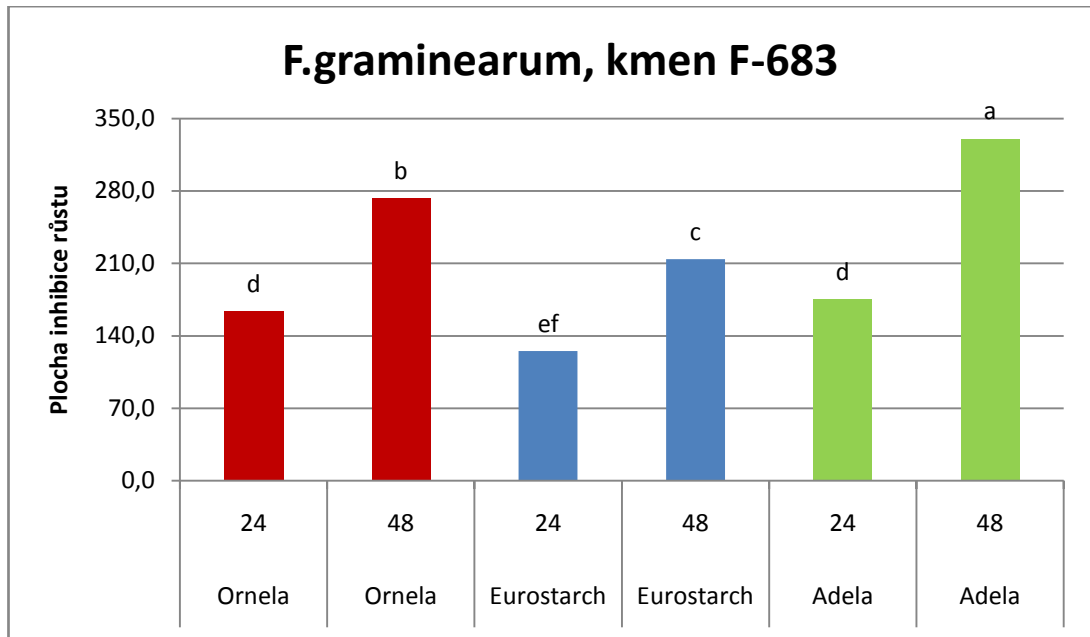
TRP -80, který byl aplikován v testech, byl izolován ze tří odrůd bramboru. Na obr. 10 je závislost plochy inhibice radiálního růstu (PIR) na odrůdě bramboru a času. Po 24 i po 48 hodinách sledování způsobil největší plochu inhibice TRP-80 izolovaný z odrůdy Adéla. Odrůdy Ornella a Eurostarch po 24 hodinách působí přibližně stejně. Po 48 hodinách větší PIR způsobil odrůda Ornella. Celkově nejmenší PIR se utvořila pro aplikaci TRP-80 z odrůdy Eurostarch.



Obr 10.: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času, ze kterého byl vyroben TRP-80

### 5.2.3 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium graminearum*, kmen F-683

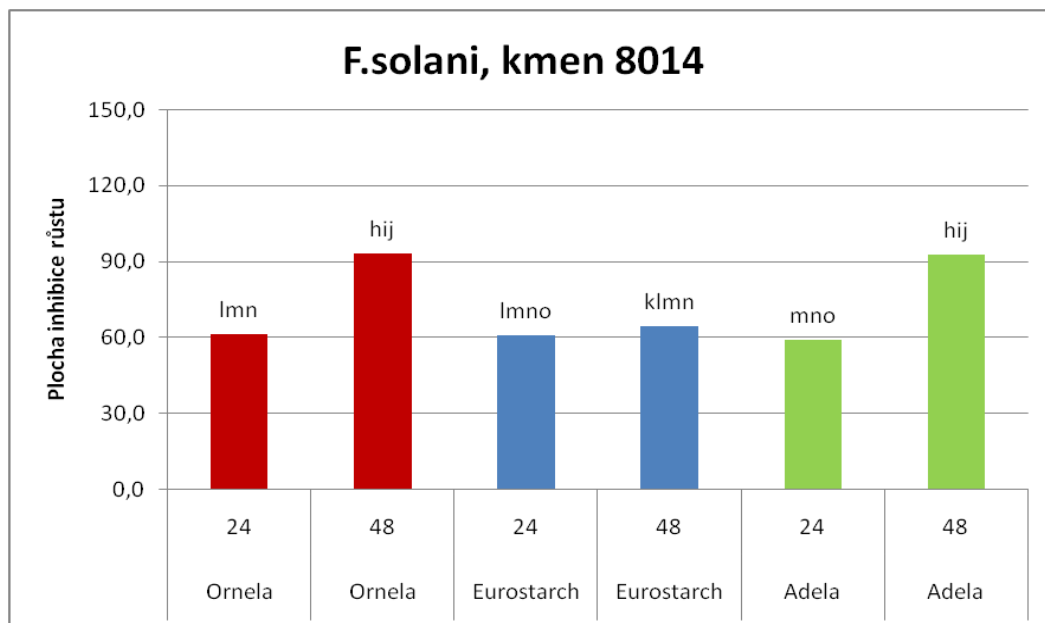
Velikost PIR u *F. graminearum* kmen F-683 byla ovlivněna velmi časem i odrůdou bramboru jak je vidět na obr. 11. Největší PIR způsobila aplikace TRP-80 izolovaného z odrůdy Adéla, 48 hodin po aplikaci se plocha téměř zdvojnásobila. Podobně čas ovlivnil velikost PIR i odrůd Ornella a Eurostarch. Nejmenší účinek na *F.graminearum* měla aplikace TRP-80 izolovaného z Eurostarch.



Obr. 11: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

### 5.2.4 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium solani*, kmen 8014

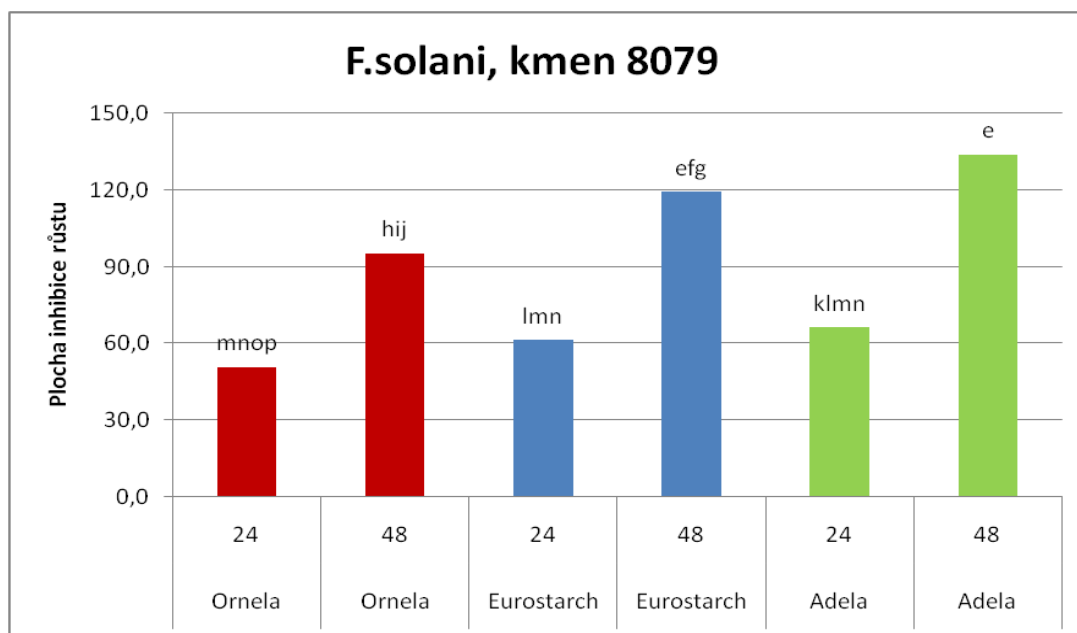
Z obr. 12 je patrné, že největší PIR u *F. solani* kmen 8014 způsobil TRP-80 izolovaný z odrůdy Ornella. U odrůdy Ornella a Adéla se PIR po 48 hodinách zvětšila o polovinu. Odrůda Eurostarch nebyla časem ovlivněna a hodnoty po 24 a 48 hodinách se příliš neliší.



Obr. 12: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

### 5.2.5 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium solani*, kmen 8079

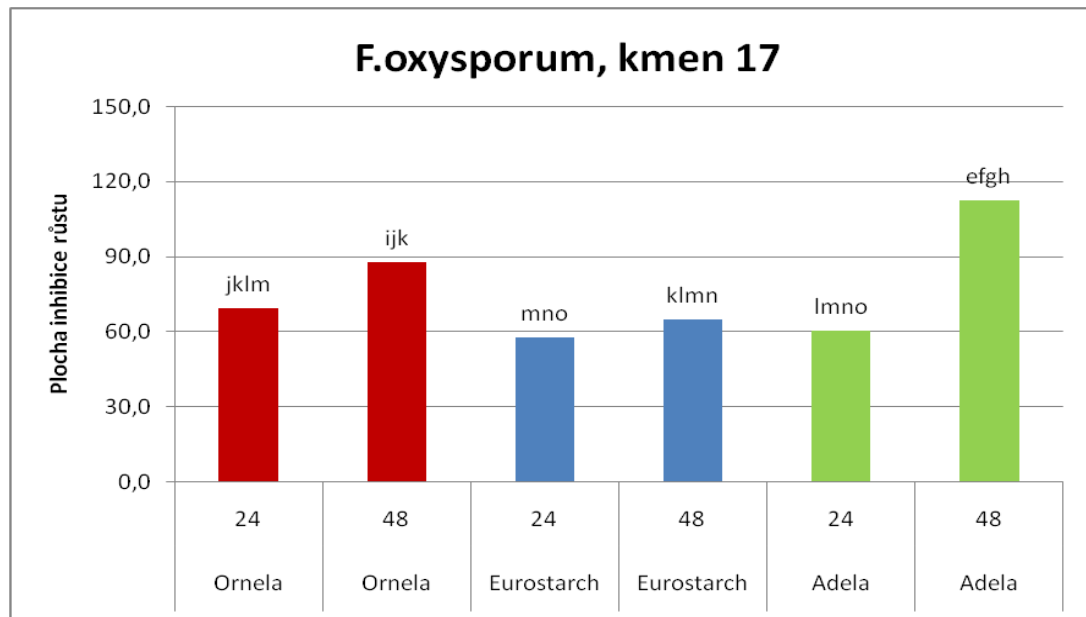
Z obr. 13 je zřejmé, že u *F. solani* kmen 8079 měl na PIR velký vliv čas a to u všech odrůd. Velikost PIR se po 48 hodinách zvětšila o polovinu. TRP-80 z odrůdy Adéla tvořil největší PIR a protein z odrůdy Ornella zase nejmenší PIR. Hodnoty naměřené po 24 hodinách se lišily minimálně, jak dokládá i Tukeyho test.



Obr. 13: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

### 5.2.6 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium oxysporum*, kmen 17

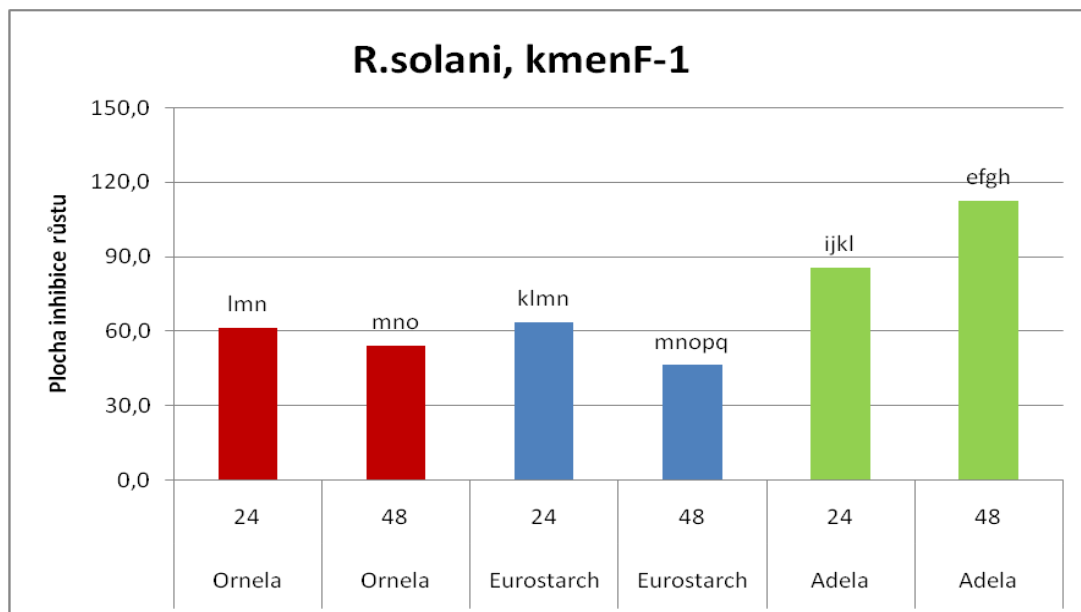
U *F. oxysporum* kmen 17 je PIR největší u odrůdy Adéla po 48 hodinách, viz obr. 14. Po 24 hodinách největší PIR byla naměřena po aplikaci TRP-80 izolovaného z odrůdy Ornella. TRP-80 z odrůdy Eurostarch byl proti *F. oxysporum* nejméně účinný a nejméně na něj působil faktor času. Faktor času se nejvíce projevil u TRP-80 z odrůdy Adéla.



Obr. 14: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

### 5.2.7 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Rhizoctonia solani*, kmen F-1

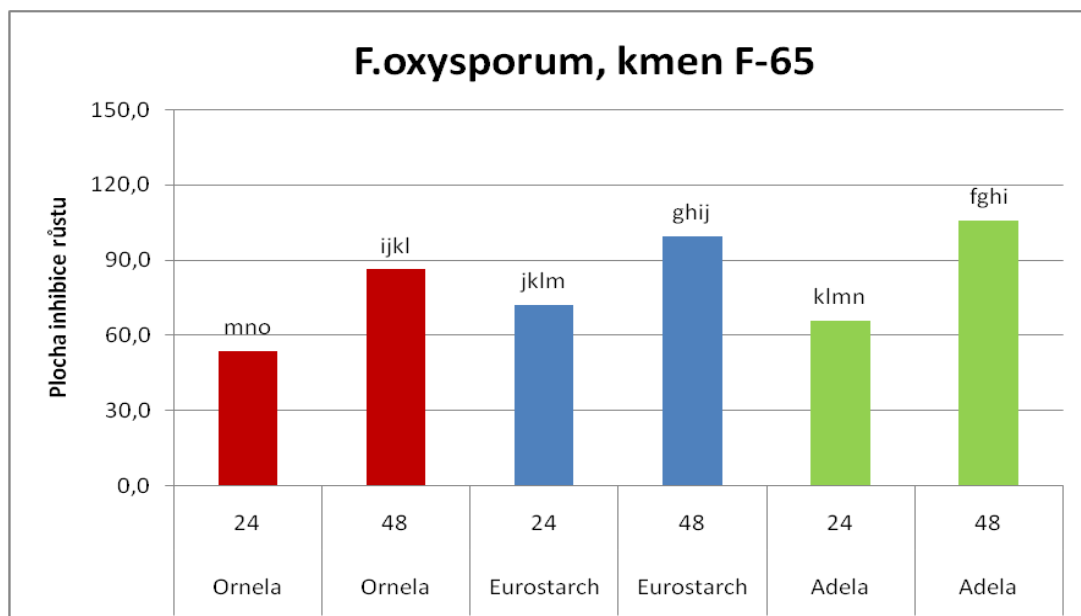
Z obr. 15 je zřejmé, že proti *R.solani* kmen F-1 nejvíce působil TRP-80 izolovaný z odrůdy Adéla, u kterého se po 48 hodinách velikost PIR zvětšila. U ostatních odrůd se velikost PIR po 48 hodinách zmenšila. Proti *R.solani* nejméně účinkoval TRP-80 izolovaný z odrůdy Eurostarch.



Obr. 15: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

### 5.2.8 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium oxysporum*, kmen F-65

Na velikost PIR u *F.oxysporum* kmen F-65 měla odrůda bramboru jen minimální vliv, jak je patrné z obr. 16. Čas měl u všech testovaných odrůd stejnou reakci, vždy se po 48 hodinách velikost PIR zvětšila.

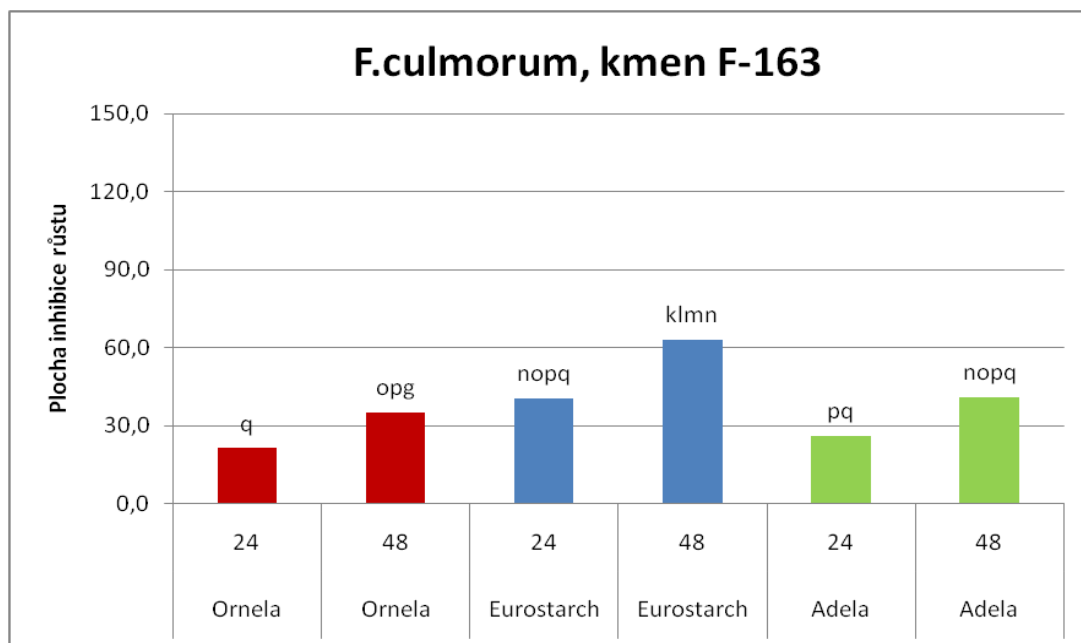


Obr. 16: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.



### 5.2.9 Vyhodnocení vlivu TRP-80 na radiální růst *Fusarium culmorum*, kmen F-163

Z obr. 17 je patrné, že na *F.culmorum* kmen F- 163 působil TRP-80 nejmenší PIR ze všech sledovaných hub. Proti *F.culmorum* nejvíce fungoval TRP-80 izolovaný z odrůdy Eurostrach. Faktor času způsobil u všech odrůd zvětšení PIR.



Obr. 17: Závislost plochy inhibice radiálního růstu v mm<sup>2</sup> na odrůdě bramboru a času. V obrázku je zahrnuto hodnocení síly testu podle Fischer LDS testu.

## 6 Diskuze

Spektrum proteinů ve vzorku bylo významně ovlivněno způsobem izolace a úpravou tepelnou koagulací. V práci Bártové & Bárty (2008) je uvedeno, že teplota při zpracování PFJ výrazně ovlivňuje spektrum peptidových resp. proteinových frakcí.

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

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

Inhibitor karboxypeptidasy (PCI) představuje nejmenší inhibitor proteas hlíz bramboru vykazující vysokou míru termostability (Pouvreau et al., 2001; Bártová et al., 2012). U tohoto peptidu byla zjištěna silná antifungální aktivita vůči významným patogenům rýže *Fusarium verticillioides*. Rostliny syntetizující hlízový inhibitor karboxypeptidasy vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči zmíněným patogenům rýže i vůči hmyzím škůdcům *Chilo suppressalis* a *Spodoptera littoralis* (Quallis et al., 2007; Bártová et al., 2012)

Významným faktorem experimentu je houbová kultura. Izolované peptidové frakce z bramboru potlačují všechny testované mikroskopické houby druhu *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum* a *Rhizoctonia solani*. Nejvíce působí na *F. graminearum* a nejméně na *F. culmorum*. *F. solani* je jeden z nejodolnějších druhů mikroskopických hub vyskytujících se na bramboru hlíznatém (*Solanum tuberosum*), proto by bylo vhodné rozšířit testy i o další hůře potlačitelné houby. Seletrenikoff (2001) ve své publikaci uvádí, že inhibitory proteas inhibují *R. solani* a dále vykazují antifungální aktivitu vůči druhu *Alternaria* a dalším patogenním houbám.

Na spektrum peptidových frakcí v hlíze má velký vliv odrůda, ze které byl TRP-80 izolován. V této práci byla použita konzumní odrůda Adéla a dvě průmyslové odrůdy Ornella a Eurostrach. Tyto odrůdy jsou zpracovány ve škrobárenském průmyslu, kde jako vedlejší produkt vzniká PFJ, ze které lze izolovat způsobem uvedeným v kapitole 4.2 inhibitory proteas. Tento odpad má potenciál, aby se v budoucnu stal materiálem pro řadu biotechnologických aplikací (Bárta et al., 2007).

Jedním z testovaných faktorů byl čas, který měl výrazný vliv na celý experiment. Pro tuto práci byla houba s TRP-80 kultivována 48 hodin. U většiny hub se po 48 hodinách kultivace PIR zvětšila. U *R. solani* kmen F-1 se velikost PIR zmenšila. Proč tomu tak bylo by mělo být předmětem dalšího výzkumu.

Mechanismus účinku inhibitorů proteas není zcela objasněn, proto by bylo pro použití inhibitorů proteas jako průmyslově izolovaných antifungálních látek nutné zaměřit výzkum i na mechanismy účinku. Heřmanová et al. (2006) v práci uvádějí, že byla u inhibitorů proteas popsána biofunkčnost – inhibice trávicích enzymů (obránná reakce vůči hmyzím škůdcům) i antifungální aktivita. Při napadení rostliny produkují patogenní organismy hydrolasy, které usnadňují pronikání patogenu do rostlinných buněk. Logickým obranným mechanismem rostlin je schopnost syntézy inhibitorů proteas, které aktivitu proteas snižují nebo zcela inhibují (Ryan, 1990; Bártová et al., 2012).

## 7 Závěr

Z výsledků experimentu se dají vyvodit následující závěry:

- Nízkomolekulární termorezistení proteiny mohou potlačovat houby rodu *Fusarium* a *Rhizoctonia*.
- Všechny čtyři testované faktory (houbová kultura a kmen, odrůda bramboru, ze které byl TRP-80 izolován, koncentrace, čas) měly průkazný přímý vliv na plochu inhibice radiálního růstu.
- V rámci experimentu měly největší vliv na radiální růst koncentrace a interakce mezi odrůdou bramboru a časem.
- Největší plochu inhibice radiálního růstu tvořil TRP-80 izolovaný z hlíz bramboru odrůdy Adéla.
- Nejmenší plochu inhibice radiálního růstu tvořil TRP-80 izolovaný z hlíz bramboru odrůdy Eurostrach.
- Na TRP-80 nejcitlivěji reagovala houba *Fusarium graminearum* (kmen F-683).
- Nejméně na experiment reagovala houba *Fusarium culmorum* (kmen F-163)

## 8 Seznam použité literatury

1. **Agrios G.N. (1988):** Plant Pathology, 3rd. ed. Academic Press, Inc.: New York. 803pp.
2. **Anonym 1 :** <http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium.php> (7.3.2014)
3. **Anonym** **2:**  
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_%28hyaline%29/Fusarium/oxysporum.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Fusarium/oxysporum.html) (15.3. 2014)
4. **Anonym 3:** <http://sciweb.nybg.org/science2/hcol/fusarium3.asp> (15.3.2014)
5. **Anonym 4:** <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography> (21.3.2014)
6. **Anonym 5:** <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm> (21.3.2014)
7. **Anonym 6:** <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/liquid-chromatography-principles/size-exclusion-chromatography> (21.3.2014)
8. **Anonym 7:** <http://www.nextbiotechnologynews.com/2011/05/size-exclusion-chromatography-sec.html> (21.3.2014)
9. **Anonym 8:** <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/liquid-chromatography-principles/ion-exchange-chromatography> (21.3.2014)
10. **Bárta J., Bártová V. (2007):** Proteiny bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 116 p.
11. **Bárta J., Bártová V. (2008):** Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. Czech J. Food Sci., 26: 347–359 p.
12. **Bártová V., Bárta J., Kamenová A., Staňková A., Čurná V. (2012):** Potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.) Chem. Listy 106, 365–372.
13. **Bárta J., Čurná V. (2004):** Proteiny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. Chemické Listy 98: 373–378 p.

14. **Bertuzzi T. et al. (2003):** Aflatoxin residues in milk of sows fed a naturally contaminated diet. *Italian Journal of Animal Science* 2, 2003, Suppl. 1, 234 – 236.
15. **Bunkry G. J., Liang J., Mittanck C. A., Seale J. W., Wu Y. S. (2002):** Antifungal proteins and methods for their use. US 6573361 B1. Dostupné z: <http://www.google.nl/patents/US6573361> (29.3.2014)
16. **Castro M.S., Fontes W. (2005):** Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2005, 12, 11-16 p.
17. **Danicke S. et al. (2001):** Effects of mycotoxin contaminated wheat and detoxifying agent on the performance of pigs and digestibility of nutrients. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*. 8. Symposium, 26.und 27. September, , Jena Thuringen, Germany, 473-476.
18. **Desjardins A. E., Proctor R. H. (2007):** Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119: 47–50 p.
19. **Edreva A. (2005):** Pathogenesis- related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Psysiology*, 2005, 31(1-2), 105-124 p.
20. **Gilchrist L., Dubin H. J. (2002):** *Fusarium* head blight, <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0j.htm> (15.4.2014)
21. **Gimeno A., Martins M. L. (2002):** Contaminants of milk and its derivates. Aflatoxin M1 and other mycotoxins control and recommendations. *Albeitar* 2002;53:52-54.
22. **Goswami, Rubella S., Krister Corby H. (2004):** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereals corps, *Molecular planth Pathology*, 5:515-525.
23. **Guevara M. G., Daleo G. R., Oliva C. R. (2001):** *Physiol. Plant* 112, 321.
24. **Guevara M. G., Oliva C. R., Machinandiarena M., Daleo G. R. (1999):** *Physiol. Plant* 106, 164.

25. **Habib H., Fazili K. M. (2007):** Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (3), pp. 068-085, August 2007
26. **Hanusová L., Čurn V. (2006):** Inhibitory proteas v hlíze bramboru. *Chem. Listy* 101: 536-541 p.
27. **Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F. (2003):** *Mol. Genet. Genomics* 269, 526.
28. **Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006):** Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chem. Listy* 100, 495 – 500 p.
29. **Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006):** Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chem. Listy* 100: 501-507 p.
30. **Jongsma M. A. (1995):** The resistance of insect to plant proteinase inhibitors. Centre for Plants Breedings and Reproduction. Wageningen. Wageningen university
31. **Kalač P. (2001):** Organická chemie přírodních látek a kontaminantů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. ISBN 80-7040-520-1
32. **Kalač P., Míka V. (1997):** Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. ISBN 80-85120-96-8
33. **Kim J.-Y., Park S.-Ch., Hwang I., Cheong H., Nah J.-W., Hahm K.-S., Park Y. (2009):** Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 2860-2872 p.
34. **Kim J.-Y., Park S.-Ch., Kim M.-H., Lim H. –T., Park Y., Hahm K.-S. (2005):** Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 (2005) 921–927 p.
35. **Koningsveld van G. A. (2001):** Psycho-chemical and functional protein of potato proteins. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, p. 147.

36. **Koningsveld van G. A.; Gruppen, H.; Jongh de H. H. J.; Wijngaards, G.; Boekel van M. A. J. S; Walstra, P.; Voragen, A. G. J.(2001):** Effects of pH and Heat Treatments on the Structure and Solubility of Potato Proteins in Different Preparations, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4889-4897.
37. **Kovalskaya N., Hammond R. W. (2009):** *Protein Expression Purif.* 63, 12.
38. **Kristinová H. (2011):** Bakalářská práce: Současné možnosti produkce bílkovinných koncentrátů z rostlinných zdrojů.
39. **Lee M. C. S., Scalon M. J., Craik D. J., Anderson M. A. A. (1999):** A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein *Nat Struct Biol* 6: 6042-6052 p.
40. **Luginbuhl S. (2010):** *Fusarium solani*. A class project for PP728 Soilborne Plant Pathogens. *Mycologia* 63: 462-477 p.
41. **Madadlou, O'Sullivan S., Sheehan D. (2011):** Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 681:439-47.
42. **Marasas W.F.O., Nelson P.E., Tousson T.A. (1984):** *Toxigenic Fusarium Species: Inedity and Mycotoicology.* The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa.
43. **Mendieta J. R., Pagano M. R., Munoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G. (2006):** *Microbiology* 152, 2039.
44. **Moreti A. N. (2009):** Taxonomy of the *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, No.* 117: 7—13 p.
45. **Nedělník J., Maravcová H., Honzlová A. (2006):** Mykotoxiny v krmivech. Dostupné z [http://www.vupt.cz/content/files/pub\\_06/nedel\\_06\\_01.pdf](http://www.vupt.cz/content/files/pub_06/nedel_06_01.pdf) (4.4.2014)
46. **Park Y., Choi B. H., Klak J.-S., Kang Ch.-W., Lim H.- T., Cheong H.-S., Hahm K.-S. (2005):** *J. Agric. Food Chem.* 53, 6491.
47. **Pots A. M. (1999):** Physico – chemici properties and thermal aggregation of patatin the major potato tuber protein. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University Wageningen, The Netherlands, 123 p.



48. **Pots A. M., Gruppen H., Diepenbeek van R., Lee van der J. J., Boekel van M. A. J. S., Wijngaards G., Voragen A. G. J. (1999):** The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 79: 1557-1564 p.
49. **Portieles R., Ayra C., Borrás O. (2006):** Basic insight on plant defensins. *Biotechnología Aplicada* 2006;23:75-78 p.
50. **Pouvreau L. (2004):** Occurrence of physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The etherlands, 157 p.
51. **Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A. (2001):** Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 286–287 p.
52. **Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A., Voragen A. G. J. (2001):** *J. Agric. Food Chem.* 49, 2864 (2001).
53. **Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998):** Fyziologie rostlin. Vydala Academia v Praze, ISBN 80-200-0586-2
54. **Quallis J., Meynard D., Vila L., Avilés F. X., Guirderdoni E. (2007):** *Plant Biotechnol. J.* 5, 537.
55. **Revina T. A., Gerasimova N. G., Kladnitskaya G. V., Halenko G. I., Valueva T. A. (2008):** *Appl. Biochem. Microbiol.*44, 89.
56. **Ryan C. A. (1990):** *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 303.
57. **Sedlářová M., Vašutová M. (2004):** Tř. *Askomycety – houby vřeckovýtrusné.* <http://botany.upol.cz/atlasysystem/ascomycetes.php> (15.3.2014)
58. **Selitrennikoff C. P. (2001):** Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* July 2001 vol. 67 no. 7 2883-2894

59. **Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q. (2013):** *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.* 14 (4):323-41.
60. **Stanford A., Bevan M., Northcote D. (1989):** *Mol. Genet. Genomics* 215, 200.
61. **Suh S.-G., Moon Y.-S., Hannapel D. J. (1999):** *J. Plant Physiol.* 154, 498
62. **Sutton D. A., Fothergill A. W., Rinaldi M. G. (1998):** *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
63. **Trenholm H.L., Friend D. H., Hamilton R.M.G. (1984):** Vomitoxin and zearalenone in animal feeds. Agriculture Canada Publication 1745 E.
64. **Valueva T. A., Revina T. A., Gvozdeva E. L., Gerasimova N. G., Ilinskaya L. I., Ozeretskovskaya O. L. (2001):** *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 512.
65. **Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Mosolov V. V. (1998):** *FEBS Lett.* 426, 131.
66. **Vincelli P., Parker G. (1995):** Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi. UK Cooperative extensit servise University of Kentucky – College of Agriculture 121
67. **Wagacha J. M., Muthomi J.W. (2007):** *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877-885.
68. **Wannemacher R. W., Wiener S. L. (1997):** Trichohecene mycotoxins. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* : chapter 34

## 9 Příloha 1

Tab. 11a: Přehled dat jednotlivých variant

	Level of	Level of	Level of	N	PIR
Total				210	0,91132
houba-kmen	F.graminearum Km F-683			30	2,136920
houba-kmen	F.solani Km 8014			30	0,719673
houba-kmen	F. solani Km 8079			30	0,877493
houba-kmen	F.oxysporum Km 17			30	0,755050
houba-kmen	R. solani Km F-1			30	0,705420
houba-kmen	F.oxysporum Km F-65			30	0,805560
houba-kmen	F.culmorum Km F-163			30	0,379143
TRP80-odrůda	Ornela			70	0,861154
TRP80-odrůda	Eurostarch			70	0,823834
TRP80-odrůda	Adela			70	1,048980
čas	24			105	0,715199
čas	48			105	1,107447
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.graminearum Km F-683	Ornela		10	2,182310
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.graminearum Km F-683	Eurostarch		10	1,697650
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.graminearum Km F-683	Adela		10	2,530800
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.solani Km 8014	Ornela		10	0,772640
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.solani Km 8014	Eurostarch		10	0,626310
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.solani Km 8014	Adela		10	0,760070
houba-kmen*TRP80-odrůda	F. solani Km 8079	Ornela		10	0,728810
houba-kmen*TRP80-odrůda	F. solani Km 8079	Eurostarch		10	0,903160
houba-kmen*TRP80-odrůda	F. solani Km 8079	Adela		10	1,000510
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km 17	Ornela		10	0,785970

Tab. 11b: Přehled dat jednotlivých variant

	Level of	Level of	Level of	N	PIR
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km 17	Eurostarch		10	0,614030
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km 17	Adela		10	0,865150
houba-kmen*TRP80-odrůda	R. solani Km F-1	Ornela		10	0,576480
houba-kmen*TRP80-odrůda	R. solani Km F-1	Eurostarch		10	0,549040
houba-kmen*TRP80-odrůda	R. solani Km F-1	Adela		10	0,990740
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km F-65	Ornela		10	0,699580
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km F-65	Eurostarch		10	0,858010
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.oxysporum Km F-65	Adela		10	0,859090
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.culmorum Km F-163	Ornela		10	0,282290
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.culmorum Km F-163	Eurostarch		10	0,518640
houba-kmen*TRP80-odrůda	F.culmorum Km F-163	Adela		10	0,336500
houba-kmen*čas	F.graminearum Km F-683	24		15	1,547947
houba-kmen*čas	F.graminearum Km F-683	48		15	2,725893
houba-kmen*čas	F.solani Km 8014	24		15	0,604427
houba-kmen*čas	F.solani Km 8014	48		15	0,834920
houba-kmen*čas	F. solani Km 8079	24		15	0,594293
houba-kmen*čas	F. solani Km 8079	48		15	1,160693
houba-kmen*čas	F.oxysporum Km 17	24		15	0,625453
houba-kmen*čas	F.oxysporum Km 17	48		15	0,884647
houba-kmen*čas	R. solani Km F-1	24		15	0,701460
houba-kmen*čas	R. solani Km F-1	48		15	0,709380
houba-kmen*čas	F.oxysporum Km F-65	24		15	0,638900

Tab. 11c: Přehled dat jednotlivých variant

	Level of	Level of	Level of	N	PIR
houba-kmen*čas	F.oxysporum Km F-65	48		15	0,972220
houba-kmen*čas	F.culmorum Km F-163	24		15	0,293913
houba-kmen*čas	F.culmorum Km F-163	48		15	0,464373
TRP80-odrůda*čas	Ornella	24		35	68,7
TRP80-odrůda*čas	Ornella	48		35	103,5
TRP80-odrůda*čas	Eurostarch	24		35	68,8
TRP80-odrůda*čas	Eurostarch	48		35	96,0
TRP80-odrůda*čas	Adéla	24		35	77,0
TRP80-odrůda*čas	Adéla	48		35	132,8
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Ornela	24	5	1,633720
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Ornela	48	5	2,730900
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Eurostarch	24	5	1,253440
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Eurostarch	48	5	2,141860
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Adela	24	5	1,756680
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.graminearum Km F-683	Adela	48	5	3,304920
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Ornela	24	5	0,613780
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Ornela	48	5	0,931500
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Eurostarch	24	5	0,608300
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Eurostarch	48	5	0,644320
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Adela	24	5	0,591200
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.solani Km 8014	Adela	48	5	0,928940

Tab. 11d: Přehled dat jednotlivých variant

	Level of	Level of	Level of	N	PIR
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Ornela	24	5	0,506680
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Ornela	48	5	0,950940
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Eurostarch	24	5	0,613540
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Eurostarch	48	5	1,192780
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Adela	24	5	0,662660
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F. solani Km 8079	Adela	48	5	1,338360
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Ornela	24	5	0,694320
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Ornela	48	5	0,877620
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Eurostarch	24	5	0,577740
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Eurostarch	48	5	0,650320
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Adela	24	5	0,604300
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	F.oxysporum Km 17	Adela	48	5	1,126000
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	R. solani Km F-1	Ornela	24	5	0,612200
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	R. solani Km F-1	Ornela	48	5	0,540760
houba-kmen*TRP80-odrůda*čas	R. solani Km F-1	Eurostarch	24	5	0,635060

Tab. 11e: Přehled dat jednotlivých variant

	Level of	Level of	Level of	N	PIR
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	R. solani Km F-1	Eurostarch	48	5	0,463020
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	R. solani Km F-1	Adela	24	5	0,857120
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	R. solani Km F-1	Adela	48	5	1,124360
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Ornela	24	5	0,536180
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Ornela	48	5	0,862980
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Eurostarch	24	5	0,722120
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Eurostarch	48	5	0,993900
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Adela	24	5	0,658400
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.oxysporum Km F-65	Adela	48	5	1,059780
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Ornela	24	5	0,213780
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Ornela	48	5	0,350800
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Eurostarch	24	5	0,405960
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Eurostarch	48	5	0,631320
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Adela	24	5	0,262000
houba- kmen*TRP80- odrůda*čas	F.culmorum Km F-163	Adela	48	5	0,411000