

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Diplomová práce

**CHARAKTERIZACE PROTEINOVÉHO SPEKTRA
PERIDERMÁLNÍCH A KOROVÝCH PLETIV HLÍZ
BRAMBORU (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)
V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM OBECNÉ
STRUPOVITOSTI**

Bc. Zuzana Reicheltová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Bárta, PhD.

Konzultant: doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.

Ostatní konzultanti: Ing. Veronika Bártová, PhD.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana REICHELTOVÁ**
Osobní číslo: **Z09802**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**
Název tématu: **Charakterizace proteinového spektra peridermálních a korových pletiv hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v souvislosti s výskytem obecné strupovitosti**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Cílem DP bude studium spektra proteinů v peridermálních a korových pletivech hlíz u druhu *Solanum tuberosum* v souvislosti s výskytem obecné strupovitosti. Studium proteinových diferencí bude probíhat během tuberizačního procesu na hlízách odebraných z rostlin kontrastního charakteru (hlízy z citlivé a odolné odrůdy vzhledem k rozvoji obecné strupovitosti). Vlastní řešení DP bude probíhat podle následujícího schématu:

- 1) Napěstování rostlinného materiálu na školitelském pracovišti (ZF JU) v rámci polních pokusů resp. ve skleníku či boxu pro pěstování rostlin - odběr vzorků hlíz.
- 2) Příprava materiálu pro analýzy - preparace pletiv, extrakce proteinů podle zavedených protokolů školitelského pracoviště.
- 3) Provedení analýz extrahovaných proteinů či jejich frakcí pomocí jednorozměrné elektrofores (techniky SDS-PAGE, PAGE, čípková elektroforesa). U vybraných vzorků bude provedena detailní analýza pomocí dvourozměrné elektrofores (2D PAGE) a stanoveny základní biochemické parametry proteinů (molekulová hmotnost, isoelektrický bod) včetně vybraných enzymových aktivit, které mohou souviset s reakcí rostlin na rozvoj obecné strupovitosti (např. aktivita lipidacylhydrolasy a superoxiddismutasy).
- 4) Získaná data budou statisticky ověřena a vyhodnocena pomocí speciálních software a dále zpracována v podobě tabulek grafů či obrazových příloh. Součástí vyhodnocení bude porovnání zjištěných výsledků s výsledky obdobných analýz u dostupných prací mezinárodního významu.

Rozsah grafických prací: 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

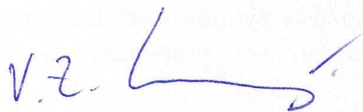
Seznam odborné literatury:

- Bárta J., Čurn V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) - klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické listy* 98: 373-378
Barel G., Ginzberg I. (2008): Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *Journal of Experimental Botany* 59: 3347-3357
Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996): *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc. New York, 415 p.
Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C. Govers F., Tailor M., MacKerron D., Ross H. (eds.) (2007): *Potato biology and biotechnology: advance and perspective*, Elsevier Inc., p. 856.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Ostatní konzultanti: **Ing. Veronika Bártová, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

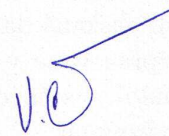
Datum zadání diplomové práce: 15. ledna 2010
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2011

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.



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

V Českých Budějovicích dne 15. ledna 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

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, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 29.4.2011

.....

Dedikace

Výsledky prezentované v této práci vznikly v rámci řešení výzkumného projektu GA JU 064/2010/Z.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za cenné odborné rady, pomoc při statistickém vyhodnocení a čas poskytnutý při zpracování této práce. Mé velké díky patří také Bc. Adéle Brabcové za pomoc a ochotu, s kterou se mi v laboratoři i mimo ni věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Jiřímu Divišovi, CSc. za poskytnutí rostlinného materiálu pro analýzy a Ing. Veronice Bártové, Ph.D. za konzultaci. Děkuji také své rodině, Mírovi a Tomášovi.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu napadení obecnou strupovitostí na proteinové složení jednotlivých vrstev bramborových hlíz s ohledem na fázi tuberizace. Analýzám byly podrobeny dvě odrůdy: obecné strupovitosti odolná odrůda Vlasta a odrůda Valfi, citlivější k napadení touto chorobou.

Laboratorními technikami byl v hlízách zjištěn obsah sušiny a množství proteinů v sušině. Elektroforetickými technikami (SDS-PAGE, 2D-PAGE) byla získána spektra proteinů v hlízách a byla analyzována oblast patatinových proteinů ve slupkách zralých hlíz odrůdy Valfi. Pomocí nativní PAGE a následnou detekcí enzymových aktivity lipidacylhydrolázy a peroxidázové aktivity byly získány profily izoenzymů.

Bylo zjištěno, že největší rozdíly v těchto profilech bylo možné zaznamenat mezi odrůdami, dále mezi pletivem slupky a vnitřními pletivy. V rámci dalších parametrů (zdravotní stav a stupeň zralosti) byly rozdíly nejmenší, většinou spíše v intenzitě pruhů proteinového spektra na gelu.

Klíčová slova: *Solanum tuberosum* L., proteiny bramborových hlíz, obecná strupovitost

Abstract

This thesis studies the influence of infection of common scab on the protein composition in individual layers of potato tubers in relation to the development phase of tuber. Two varieties were analysed: Vlasta (common scab-resistant variety) and variety Valfi (more sensitive to attack by this disease).

With laboratory techniques were found amount of dry matter in tuber and content of protein in dry matter. By electrophoretic techniques (SDS-PAGE, 2D-PAGE) was obtained profiles of proteins in tubers and analyzed area patatin proteins in the skins of mature tubers of the variety Valfi. Using native PAGE and subsequent detection of enzyme activity lipacylhydrolase and peroxidase activity were obtained profiles isoenzymes.

It was found that the greatest differences in these profiles could be recorded between varieties, as well as among mesh skin and internal tissues. The other parameters (health status and level of maturity) were the smallest differences, mostly rather in the intensity of protein bands of the spectrum.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., potato tuber proteins, common scab

Obsah

1.	Úvod	10
2.	Literární přehled.....	11
2.1.	Brambor hlíznatý (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	11
2.2.	Bramborová hlíza.....	11
2.2.1.	Anatomie hlízy	12
2.2.2.	Chemické složení hlízy.....	13
2.3.	Proteiny v hlízách bramboru	14
2.3.1.	Patatin	15
2.3.2.	Inhibitory proteáz (PI's)	17
2.3.3.	Ostatní proteiny	19
2.4.	<i>Streptomyces scabies</i>	19
2.5.	Obecná strupovitost brambor	21
2.6.	Použité metody.....	23
2.6.1.	Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)	23
2.6.2.	Polyakrylamidová elektroforéza SDS-PAGE.....	23
2.6.3.	Automatická čipová elektroforéza Experion	25
2.6.4.	Sloupcová chromatografie	25
2.6.5.	Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (2D-PAGE)	26
3.	Cíle práce	28
4.	Materiál a metody	29
4.1.	Pěstování materiálu a příprava vzorků.....	29
4.1.1.	Odrůda Vlasta	29
4.1.2.	Odrůda Valfi	30
4.2.	Stanovení obsahu sušiny	30
4.2.1.	Stanovení obsahu proteinů v sušině bramborových hlíz.....	31
4.2.2.	Extrakce proteinů.....	31
4.2.3.	Stanovení obsahu proteinů.....	31

4.3.	Elektroforetické stanovení hlízových proteinů	31
4.3.1.	Automatická čipová elektroforéza Experion	31
4.3.2.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza SDS-PAGE	32
4.3.3.	Chromatografická purifikace patatinu pro 2D-PAGE	33
4.3.4.	Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (2D-PAGE)	35
4.4.	Detekce enzymových aktivit hlízových proteinů	36
4.5.	Zpracování dat	37
4.	Výsledky	38
4.1.	Stanovení obsahu sušiny a proteinů v sušině hlíz	38
4.1.1.	Průměrná hmotnost hlíz	38
4.1.2.	Obsah sušiny v hlízách	38
4.1.3.	Kvantifikace proteinů v sušině hlíz	40
4.2.	Hodnocení profilu proteinových spekter pomocí SDS-PAGE	43
4.3.	Hodnocení izoenzymových spekter po nativní PAGE	48
4.3.1.	Aktivita lipidacylhydrolázy	48
4.3.2.	Peroxidázová aktivita	51
4.4.	Hodnocení profilu proteinů pomocí 2D-PAGE	55
5.	Diskuze	56
5.1.	Obsah sušiny a stanovení proteinů v sušině hlíz	56
5.2.	Analýza spekter hlízových proteinů	57
5.2.1.	SDS-PAGE	57
5.2.2.	2D-PAGE	58
5.3.	Hodnocení spekter izoenzymů na gelu po nativní PAGE	58
6.	Závěr	60
7.	Seznam použité literatury	62
8.	Přílohy	68

1. Úvod

Brambor hlíznatý je významnou plodinou českého i světového zemědělství. Důležité místo zaujímá hlavně v lidské výživě a zpracovatelském průmyslu. Obsahuje hodně škrobu a důležitých vitaminů. Význam proteinů je pro poměrně nízký obsah konzumenty často opomíjen, ačkoliv se jedná o proteiny nutričně hodnotné.

Brambory jsou napadány mnoha hospodářsky významnými chorobami. Obecná strupovitost sice nezpůsobuje ztráty na výnosech, je však spojena se znehodnocením vzhledu bramborových hlíz. V současné době, kdy konzumenti vyžadují brambory kvalitní i po této stránce, nabývá tedy tato choroba na významu. Proto se klade důraz i na šlechtění odrůd odolných této chorobě, ačkoliv rezistentní odrůda se vyšlechtit dosud nepodařila.

Změny v hlízách vyvolané obecnou strupovitostí nejsou dosud zcela objasněny a jsou tedy předmětem mnoha výzkumů. Snahou této práce je prohloubení znalostí o diferencích v bramborových hlízách na proteinové úrovni vzniklých v souvislosti s napadením patogenem *Streptomyces scabies* a v průběhu zrání hlíz a přispět tak k rozšíření znalostí o interakcích mezi rostlinou a tímto patogenem.

2. Literární přehled

2.1. Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.)

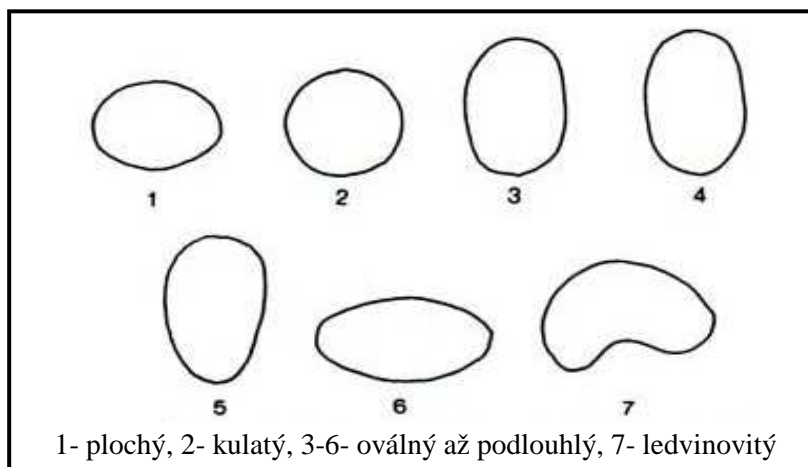
Celosvětově se využívá 5 hlavních hlíznatých rostlin, z nichž nejdůležitější plodinou je brambor hlíznatý (Hanusová, Čurn, 2007). Je to jediná hlíznatá rostlina rostoucí mimo tropy a z celkové produkce všech hlíznatých plodin zaujímá 45 % (Shewry, 2003). Jedná se o víceletou rostlinu, ale v zemědělství je užívána jako jednoletá plodina (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Kulturní brambor se téměř ve všech zemích rozmnožuje pouze vegetativně pomocí hlíz (Rybáček, 1988).

V současnosti je u nás registrováno 155 odrůd (Čermák, 2010). V roce 2009 bylo v ČR podle údajů Českého statistického úřadu sklizeno celkem 36 722 ha brambor. Celková produkce brambor dosáhla 928,8 tisíc tun a průměrný hektarový výnos byl 25,29 t/ha. Změny ve stravovacích zvyklostech obyvatelstva, rychlá občerstvení a moderní způsob života mají vliv na pokles celkové spotřeby brambor nejen v ČR, ale ve všech vyspělých evropských zemích. Podle statistických údajů spotřeba brambor spíše klesá a v roce 2009 dosáhla 62,1 kg brambor na obyvatele a rok (Žižka, 2009).

2.2. Bramborová hlíza

Bramborová hlíza je ztlustlý stolon sloužící jako přirozený vegetativní rozmnožovací orgán. Proto je hustě osazena spícími pupeny a je v ní vysoká koncentrace zásobních látek. Hlízy představují jedinou využitelnou část celé rostliny bramboru (Hanusová, Čurn, 2007; Rybáček, 1988) a neodmyslitelně patří do jídelníčku většiny obyvatel Evropy a Ameriky, ale i ostatních světadílů (Bárta, Bártová, 2007). Význam bramborové hlízy je spojen s vysokým obsahem škrobu a v případě lidské výživy je hlíza také důležitým zdrojem vitamínu C, B6 a B1 a draslíku, železa a hořčíku. Brambory patří mezi jeden z nejlepších zdrojů antioxidantů (obsahují např. polyfenoly, askorbovou kyselinu a karotenoidy) (Bárta, Čurn, 2004; Vreugdenhil *et al.*, 2007). Každá rostlina je schopná vyprodukovat 4-20 hlíz. Bramborové hlízy mohou mít tvar kulatý, vejčitý, podlouhlý až ledvinovitý (obr. 1).

Obrázek č. 1: Tvary bramborových hlíz (Lisińska, Leszczyński, 2002):



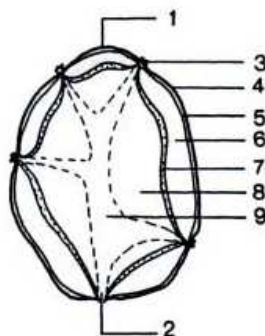
Přestože je tvar hlíz odrůdovým znakem, může u jednotlivých odrůd docházet v rámci modifikačního vlivu prostředí k tvarovým odchylkám. Hlízy se mohou lišit rovněž ve velikosti – nabývají velikosti od 10 mm do 120 mm.

2.2.1. Anatomie hlízy

Hlíza je rozdělena na část korunkovou (vrcholovou) související se stolonem a část pupkovou. V korunkové části hlíz jsou spirálovitě umístěna očka – tato část je oproti pupkové bohatší na očka. Očka mohou být jen stěží vidět, ale mohou být i několik milimetrů hluboká.

Na obrázku podélného řezu (obr. 2) pak můžeme rozeznat dřev, parenchym, cévní svazky, kůru a slupku. Pokožka hlíz může mít světle žlutou, žlutou, červenou nebo fialovou barvu, zatímco dužnina může mít jakýkoliv odstín žluté, bílé nebo krémové barvy (Lisińska, Leszczyński, 2002).

Obrázek č. 2: Řez hlízou (Lisińska, Leszczyński, 2002):



1 – korunková část, 2 – pupek, 3 – očko, 4 – slupka, 5 – kůra, 6 – parenchym, 7 – kruh cévních svazků, 8 – parenchym, 9 – dřeň

2.2.2. Chemické složení hlízy

Chemické složení hlízy závisí do velké míry na genetickém založení rostliny- dokonce hlízy stejné rostliny se mohou v látkovém složení velmi lišit. Mezi další vlivy na chemické složení patří stáří a stupeň vývoje hlízy (obsah škrobu se zvyšuje, zatímco obsah glukózy a fruktózy klesá), stejně tak podmínky ekologické (např. půdní podmínky, počasí a choroby). Složení hlízy se také mění během skladování (Lisińska, Leszczyński, 2002; Vreugdenhil *et al.*, 2007).

Celkový obsah vody v hlíze je průměrně 75 % z celkové hmotnosti hlízy. Zbýlých 25 % pak tvoří sušina s řadou látek. Nejvíce sušiny se nachází v zásobním parenchymu mezi kůrou a vaskulárním kruhem (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Nejdůležitějšími látkami v sušině jsou škrob (tvoří 13-24 % hmotnosti hlízy – závisí na odrůdě resp. genotypu), ostatní polysacharidy, které představují 0,5 % celkové hmotnosti hlízy a na 1,5 % čerstvé hmotnosti hlízy se pak podílí proteiny (Hanusová, Čurn, 2007).

Dusíkaté látky hlíz brambor (N – látky)

Většina používaných metod používaných při analýze obsahu dusíkatých látek je založena na stanovení obsahu dusíku a následném přepočtu koeficientem 6,25 na obsah tzv. hrubých proteinů.

Dusíkaté látky tvoří v průměru 7,94 % sušiny. Velká většina dusíku obsaženého v hlíze (90 %) je rozpustná ve vodě. Hlízy menší velikosti obsahují větší množství N –

látek. Distribuce dusíku v hlíze bramboru není rovnoměrná. Nejvíce N – látek se vyskytuje v jádře a nejméně v pupkové části hlízy. Nerozpustné proteiny se pak nejvíce vyskytují ve slupce hlízy. (Bárta, Bártová, 2007; Lisińska, Leszczyński, 1989). Tyto slupkové proteiny plní 3 hlavní funkce – účastní se metabolismu rostliny, proliferace buněk a stresové odpovědi (Barel, Gintzberg, 2008).

Bramborové hlízy obsahují následující frakce N – látek: 50 % představují proteiny, 15 % volné aminokyseliny (vedle běžných aminokyselin se vyskytují v hlíze i méně obvyklé aminokyseliny jako např. β -alanin (Rybáček, 1988)), 23 % amidy a 12 % ostatní dusíkaté látky (např. glykoalkaloidy, sekundární metabolity acetylcholin, adenin, kadaverin, guanin, hypoxanthin, narkotin, trigonelin, xanthin) (Bárta, Bártová, 2007).

2.3. Proteiny v hlízách bramboru

Bramborové proteiny jsou významnou složkou hlízy brambor i přes jejich nízkou koncentraci v čerstvé hmotě. Patří mezi nutričně nejvýznamnější proteiny rostlinného původu. Nutriční hodnota proteinů je určována hlavně jejich aminokyselinovou skladbou. Značný význam má poměrně vysoký obsah leucinu (Bárta, Čurn, 2004). Vyskytuje se zde i menší množství sirných aminokyselin – methioninu a cysteinu (Vreugdenhil *et al.*, 2007).

Proteiny jsou důležitou součástí buněčných membrán (jsou do velké míry zodpovědné za jejich specifické vlastnosti), stejně jako různých cytoplazmatických struktur. Plní také úlohu enzymů.

U pozdních odrůd obsah proteinů v hlíze stoupá až do doby sklizně, u raných brambor dosahuje maxima a následně klesá v poslední fázi vegetačního období (Lisińska, Leszczyński, 1989).

Použití techniky SDS-PAGE pro separaci hlízových proteinů vedlo k definování tří významných skupin: patatin, inhibitory proteáz a ostatní proteiny (Bárta, Čurn, 2004).

2.3.1. Patatin

Patatin je triviální název pro skupinu imunologicky identických glykoproteinů s molekulovou hmotností 40-43 kDa. V nativní formě je považován za dimer (Bárta, Bártová, 2008). Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových izoform, které byly rozděleny do čtyř skupin – A, B, C, D (Bárta, Bártová, 2007). Biochemické vlastnosti těchto izoform uvádí následující tabulka.

Tabulka č. 1: Charakteristika biochemických vlastností A, B, D izoform patatinu odrůdy Bintje (Bárta, Bártová, 2007):

	patatin	izoforma A	izoforma B	izoforma D
SDS-PAGE	43 kDa	43 kDa	43 kDa	43 kDa
IEF-PAGE	6 pruhů, pH 4,6-5,2	2 pruhy, pH 5-5,2	2 pruhy, pH 4,6-4,7	2 pruhy, pH 4,7
Nativ PAGE	2 pruhy	1 pruh (horní)	1 pruh (spodní)	1 pruh (spodní)
MALDI-TOF MS	40345 Da, 41590 Da	40405 Da, 41631 Da	40330 Da, 41599 Da	40473 Da, 41703 Da

Rozdíl v molekulové hmotnosti jednotlivých izoform tohoto proteinu je způsoben přítomností dvou až tří glykosylačních míst v kombinaci s mutacemi v primární sekvenci patatinu. Hodnota izoelektrického bodu proteinů patatinového komplexu se pohybuje v rozpětí pH 4,6-5,2

Patatin byl nalezen prakticky ve všech odrůdách brambor. Geny pro patatin jsou exprimovány hlavně v hlízách, v ostatních pletivech výrazně méně (Bárta, Bártová, 2008). V hlízách je lokalizován v centrálních vakuolách parenchymatických buněk. Komplex patatinu zde tvoří 20-40 % rozpustných proteinů. To ukazuje na zásobní funkci tohoto proteinu (Bárta, Bártová, 2007; Jiménez *et al.*, 2003). Patatin může také způsobovat i alergické reakce. Jeho alergenicita se ale tepelnou úpravou snižuje (Shewry, 2003).

Patatin vykazuje i řadu enzymových aktivit a hraje tak roli v obranném mechanismu bramboru (Hanusová, Čurn, 2007). U patatinu byla zjištěna antifungální a pesticidní aktivita (Barel, Gintzberg, 2008).

Aktivita nescifické lipidacylhydrolázy (LAH aktivita)

Jedná se o esterázovou aktivitu a to jak pro tvorbu voskových esterů, tak pro deacylaci lipidů. U tohoto enzymu byla zjištěna vysoká aktivita vůči substrátům, jako jsou fosfolipidy, monoacylglyceroly a *p*-nitrofenylové estery karboxylových kyselin (Jiménez *et al.*, 2003). Střední aktivita byla zjištěna vůči galaktolipidům a zcela neaktivní se patatin jeví vůči diacyl- a triacyl-glycerolům. Rozdíly v LAH aktivitě mezi odrůdami jsou značné. To je důvod, proč se předpokládá vztah mezi úrovní LAH aktivity a rezistencí odrůdy, podle něhož by měly být odrůdy s nízkou úrovní LAH aktivity patatinu méně odolné než odrůdy s úrovní vyšší. Tato teorie se ale při šlechtění brambor dosud nepotvrdila (Bárta, Bártová, 2007).

Patatin jako cytosolová fosfolipáza A₁ a A₂

Aktivita cytosolové fosfolipázy A₂ je ale mnohem vyšší a patatin je tedy spíše označován jako enzym s A₂ aktivitou. Fosfolipáza A₂ je lipolytický enzym katalyzující hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin za uvolnění kyseliny linolové nebo linolenové. Aktivita patatinu závisí jak na typu substrátu, tak na hodnotě pH (nejvyšší aktivita byla zaznamenána při hodnotách pH 7,5 až 9). To naznačuje, že A₂ aktivita patatinu je v rostlině regulována jeho lokalizací. Patatin je neaktivní, jestliže se nalézá ve vakuolách (nízké pH) a pokud se dostane po napadení rostliny do cytosolu (zásadité prostředí) stává se aktivním. Jeho aktivita je také indukována přítomností Ca²⁺ (Bárta, Bártová, 2007).

Aktivita β-1,2-xylosidázy

Izolovaná β-1,2-xylosidáza má schopnost uvolňovat xylosidázové molekuly z β-manózy. Podstata fyziologické funkce tohoto enzymu v hlízách brambor je ale dosud neznámá (Bárta, Bártová, 2007).

Aktivita kyselá β-1,3-glukanázy

Mechanismus účinků enzymů s touto aktivitou spočívá v hydrolýze struktury β-1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupné oslabování buněčných stěn vede k lyzi buněk (Heřmanová *et al.*, 2006). Rostlinné enzymy s aktivitou β-1,3-glukanázy jsou řazeny mezi PR proteiny (pathogenesis related proteins), které souvisí

s obranou rostliny při napadení patogenem. U patatinu byla tato aktivita prokázána vůči mikroorganismu *Phytophthora infestans* (Bárta, Bártová, 2007).

Aktivita superoxiddismutázy (SOD)

Hlavní fyziologickou funkcí tohoto enzymu je ochrana aerobních organismů před škodlivými vlivy volných superoxidových radikálů. SOD katalyzuje dismutaci těchto radikálů na méně škodlivý peroxid vodíku.



Tato reakce probíhá spontánně při hodnotách pH 7,7 (McCord *et al.*, 1971). V buňkách se vyskytují 2 formy tohoto enzymu. První forma, která se nachází převážně v cytoplazmě, obsahuje ve struktuře měď a zinek. V mitochondriích se pak nachází SOD obsahující mangan (Sun *et al.*, 1988). Obsah tohoto enzymu může být ovlivněn podmínkami skladování. Hlízy skladované při 3 °C obsahovaly zvýšené množství SOD (až o 72 %) ve srovnání s hlízy skladovanými v 9 °C (Spsychalla, Desborough, 1990).

Aktivita peroxidázy

Existuje 5 izoforem tohoto enzymu. Nejvíce peroxidáz se u brambor vyskytuje ve slupce, kde hrají důležitou roli v suberizačním procesu. Jsou tak důležitým článkem obranného mechanismu brambor (Barel, Ginzberg, 2008).

Mimo suberizaci jsou zahrnuty i v dalších fyziologických procesech (např. metabolismus auxinů, biosyntéza ethylenu, růst a senescence) (Barkai- Golan, 2001).

2.3.2. Inhibitory proteáz (PI's)

Tato skupina proteinů tvoří kolem 30 % celkového proteinu v bramborové hlíze. Ve srovnání s patatinem jsou PI's mnohem heterogennější skupinou. Liší se svou molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením, hodnotou izoelektrického bodu a inhibiční aktivitou. Základní úlohou této skupiny je kontrola proteolýzy.

Dělí se podle různých kritérií, např. podle typu enzymu, který inhibují nebo podle aminokyselinového zbytku ve svém aktivním místě. Dále je můžeme rozdělit na základě molekulové hmotnosti, stavby proteinu nebo hodnoty isoelektrického bodu a počtu disulfidových můstků v molekule. V tzv. potato klasifikaci se PI's rozdělují do tří

odlišných tříd. První třídu tvoří bramborový inhibitor I (PI-1) serinových proteáz. Jedná se o pentamer, jehož molekulová hmotnost je 40 kDa. Představitelem druhé třídy je bramborový inhibitor II (PI-2). Tato skupina je tvořena dimery inhibitorů serinových proteáz – podjednotky jsou spojeny disulfidovými můstky. Do třetí třídy náleží proteázy s molekulovou hmotností 20-22 kDa. Tato třída se dále dělí do 4 skupin: inhibitory proteáz Kunitzova typu, inhibitory cysteinových proteáz, aspartátových proteáz a inhibitor karboxypeptidázy. Všechny PI's v této třídě jsou monomery. Liší se typem proteázy, kterou inhibují, a počtem cysteinových zbytků na podjednotku (tab. 2).

Tabulka 2: Rozdělení inhibitorů proteáz podle hlavní a specifické klasifikace (Hanusová, Čurn, 2007):

Skupina	MW (kDa)	Podjednotka	Inhibované enzymy	Třída a skupina v tzv. potato klasifikaci PI's
<i>Třída inhibitorů serinových proteáz</i>				
Inhibitory Kunitzova typu	21-23	1	T, C	III, 1
Inhibitor I z bramboru	40	4-5	T, C, S	I
Inhibitor II z bramboru	20-21	2	T, C, E	II
<i>Třída inhibitorů cysteinových proteáz</i>				
Multicystatiny	85	1	P	
Inhibitory Kunitzova typu	20-21	1	T, P, CB, CL	III, 2
<i>Třída inhibitorů asparagových proteáz</i>				
Inhibitory Kunitzova typu	20-22	1	CD	III, 3
<i>Třída inhibitorů metalloproteáz</i>				
Inhibitor karboxypeptidázy	4	1	CaP	III, 4

T- trypsin, C- chymotrypsin, S- subtilisin, E- elastáza, P- papain, CB- kathepsin, B, CL- pathepsin L, CD- pathepsin D, CaP- karboxypeptidáza

PI's mohou hrát v rostlinách celou řadu odlišných rolí. Po napadení škůdcem nebo patogenem dochází ke zvýšení obsahu PI's v okolí poranění i v celé rostlině. Z toho lze odvodit, že PI's hrají důležitou roli i v obranném mechanismu rostliny. Většinu PI's zapojených do tohoto procesu tvoří inhibitory serinových proteáz (na rozdíl od inhibitorů cysteinových proteáz, které jsou méně časté). PI's jsou přítomné v hlízách v relativně velkém množství i bez předchozí indukce poraněním a to nasvědčuje tomu, že PI's mohou sloužit i jako zásobní proteiny (zdroj cysteinu). Dále

mohou působit jako regulátory proteolytické aktivity i jako součást programované buněčné smrti. (Hanusová, Čurn, 2007; Hraška *et al.*, 2006)

2.3.3. Ostatní proteiny

Tyto proteiny nelze na základě podobných vlastností zařadit k proteinům patatinového komplexu, ani se nejedná o proteiny inhibující proteázy. Skupina ostatních proteinů představuje 20-30 % z extrahovatelných proteinů hlíz. Jedná se o proteiny s vysokou molekulovou hmotností (vyšší než 40kDa) Do této skupiny patří polyfenoloxidázy, proteinkináza, enzymy s účastí na syntéze škrobu a fosforylázové isoenzymy. První místo ale z hlediska důležitosti patří lektinům. Důvodem je jejich zapojení do obranného mechanismu rostlin, kde indukují shlukování buněk (Bárta, Bártová 2007; Hanusová, Čurn, 2007).

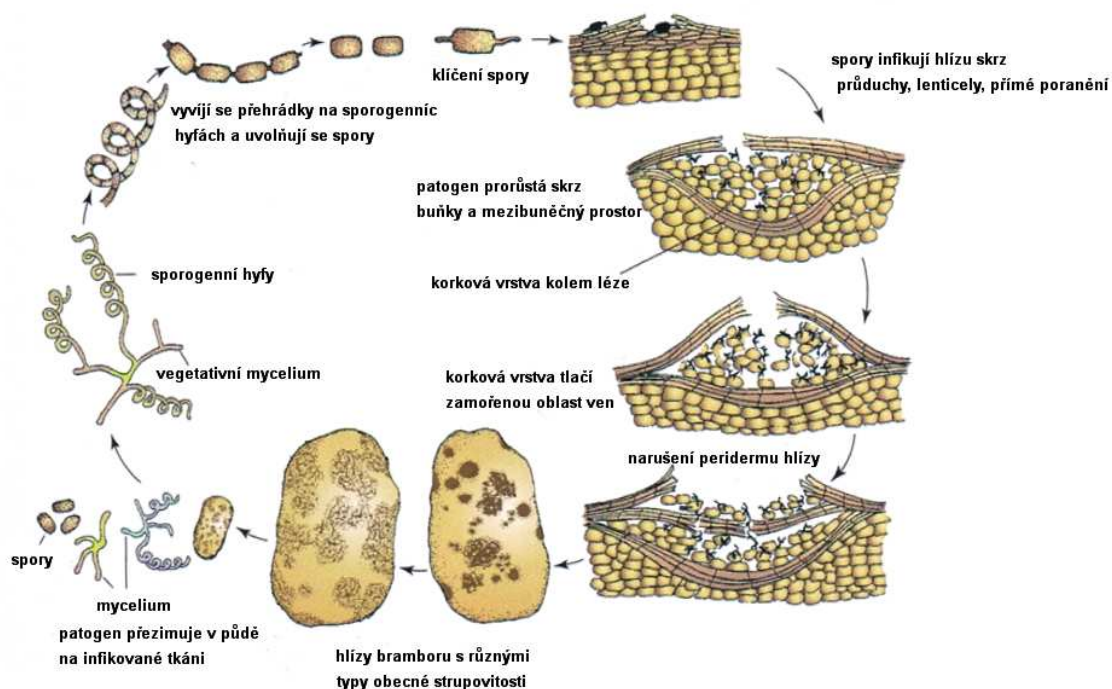
2.4. *Streptomyces scabies*

Brambory jsou ve srovnání s jinými polními plodinami značně napadány různými fytopatogenními mikroorganismy. Jednu ze závažných chorob (z ekonomického hlediska) – obecnou strupovitost brambor – způsobuje *Streptomyces scabies*.

Streptomyces scabies Lambert & Loria 1989 (dále Ss) je gram-pozitivní, přísně aerobní bakterie. Patří do čeledi *Streptomycetaceae*, jež je zařazena do třídy *Actinobacteria* v oddělení *Firmicutes* (Kůdela *et al.*, 2002). Tento významný patogen brambor se řadí mezi bakterie, ačkoli se od ostatních fytopatogenních bakterií liší tvorbou pro růst důležitých, hyfám podobných struktur (Vreugdenhil *et al.*, 2007).

Kolonie bakterií na živných půdách jsou malé (1-10 mm v průměru), zprvu hladké, později se objevuje šedavé mycelium tvořené tenkými rozvětvenými vlákny. Na specializovaných hyfách jsou pak tvořeny spirálovité řetízky válcovitých spor o velikosti 0,6 až 1,5 μm . Spory po oddělení od mycelia mohou klíčit a tvořit další mycelium (Agrios, 2005). Infekční cyklus je znázorněn na obr. 3.

Obrázek č. 3: Infekční cyklus *Streptomyces scabies* (převzato od Agrios, 2005):



Ss žije v půdě, kde kolonizuje substrát a okolí organických složek. V půdě a rostlinných zbytcích dokáže *Ss* přežívat i více než 10 let (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Optimální teplota pro růst *Ss* je 30 °C, naopak růst potlačuje vysoká půdní vlhkost (Loria *et al.*, 1997). Dalším důležitým faktorem pro růst *Ss* je kationtová výměnná kapacita půdy ovlivňující poutání a uvolňování živin z půdy do rostliny a dále akumulace prvků v peridermu hlízy. Např. poměr Ca/P v peridermu hlízy je v přímé souvislosti s intenzitou napadení hlíz tímto patogenem (Křišťufek *et al.*, 2003). Tato bakterie se také více vyskytuje v půdách s hodnotami pH 5,2 až 8. Mimo tyto limity se výskyt *Ss* snižuje. Patogen se může šířit půdou, půdní vodou a infikovanou sadbou. Do pletiv proniká lenticelami, poraněními a průduchy v časných stádiích vývoje hlíz a to skrz intracelulární prostory. Mladé hlízy jsou totiž mnohem citlivější k napadení, než je tomu u hlíz zralejších (Agrios, 2005).

Hlavním virulentním faktorem *Ss* je produkce thaxtominů. Tyto fytotoxiny jsou kódované genem *txtABC* (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Thaxtomy inhibují syntézu celulózy v napadeném pletivu a indukují tvorbu nekrotické a hypertrofie rostlinných buněk (Cullen *et al.*, 2007; Loria *et al.*, 2008). Dalším faktorem virulence je malý nekrogenní protein kódovaný genem *nec1*. *Nec1* protein není ale nezbytný pro produkci thaxtominu. Oba tyto geny (*txtABC* a *nec1*) spolu s dalšími, s virulencí spjatými, geny

jsou umístěny na chromosomálním úseku zvaném „pathogenicity island“ (PAI) (Kers *et al.*, 2005). *Ss* také produkuje další fytotoxickou sloučeninu zvanou concanamycin. Role tohoto toxinu ale zatím zůstává neobjasněna (Bouarab *et al.*, 2009).

Ss může také způsobovat strupovitost ředkviček, vodnice a mrkve a napadá také burské oříšky (Loria *et al.*, 1997).

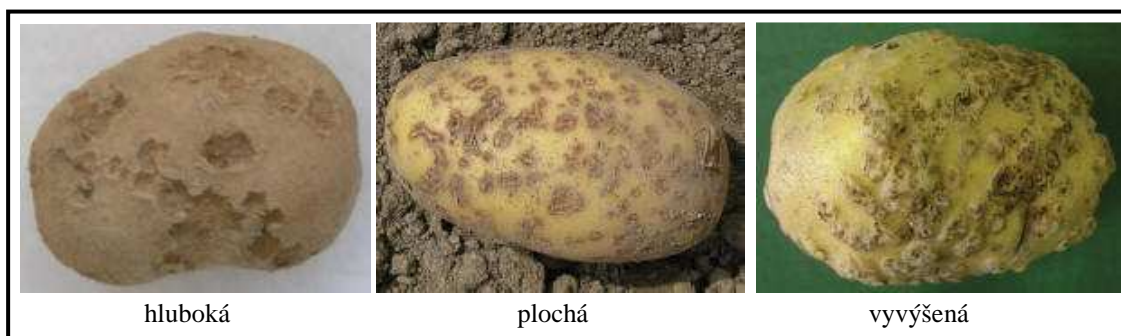
2.5. Obecná strupovitost brambor

Obecná strupovitost je rozšířená a významná choroba brambor, i když nesnižuje přímo výnosy. Znehodnocuje však vzhled a kvalitu konzumních i sadbových hlíz (Rybáček, 1988). Podle rozsahu onemocnění může tato choroba snížit i klíčivost sadby, ztížit skladování brambor (Křišťůfek *et al.*, 2003). Napadené buňky se také stávají vstupní branou dalším patogenním bakteriím (Agrios, 2005). Zvýšený výskyt onemocnění hlíz strupovitostí můžeme zaznamenat v letech se suchým a teplým jarem. Odrůdy brambor mají rozdílnou náchylnost k tomuto onemocnění, ale zcela odolné odrůdy zatím neexistují (Křišťůfek *et al.*, 2003). Výběr a použití vhodné odrůdy je považováno za nejvýznamnější opatření proti výskytu této choroby. Rozhodující význam má ve výskytu strupovitosti také volba stanoviště (Diviš, Křišťůfek, 2003).

Přítomnost a aktivita patogenu *Ss* představuje pro rostlinu stresový faktor, který může narušit normální buněčný metabolismus. Společnou charakteristikou stresových podmínek je produkce toxických radikálů jak rostlinou, tak mikroorganismy. Rostliny vlastní tzv. antioxidantní obranný systém, který zahrnuje různé molekuly a enzymy. Z neenzymatických komponentů to jsou např. vitamín C, glutathion, α -tokoferol, karotenoidy. K enzymatickým komponentům patří např. superoxidodismutáza, peroxidázy, kataláza a glutathionreduktáza (Křišťůfek *et al.*, 2003).

Na infikovaných hlízách se nejprve tvoří malé nahnědlé skvrny. Později se skvrny zvětšují, navzájem splývají a korkovatí. Mohou být hluboké až 4 mm (Agrios, 2005). Systémová infekce dosud zaznamenaná nebyla. V závislosti na virulenci kmenů patogena a náchylnosti odrůdy bramboru mohou být léze povrchové, vyvýšené nebo prohloubené (obr. 4).

Obrázek č. 4: Typy obecné strupovitosti na hlízách brambor (Anonymus 1):



Většina lézí má ale vyvýšený, drsný, korkovitý vzhled. (Babcock *et al.*, 1993). Při mírné formě obecné strupovitosti je porušena jen slupka. Projevem silné rekce na napadení je tvorba korkových vrstev a ztloustnutí povrchových pletiv (Kúdela *et al.*, 2002; Loria *et al.*, 1997). Různé stupně napadení hlíz obecnou strupovitostí můžeme vidět na obrázku č. 5.

Obrázek č. 5: Stupnice napadení hlíz obecnou strupovitostí (Anonymus 2):



2.6. Použité metody

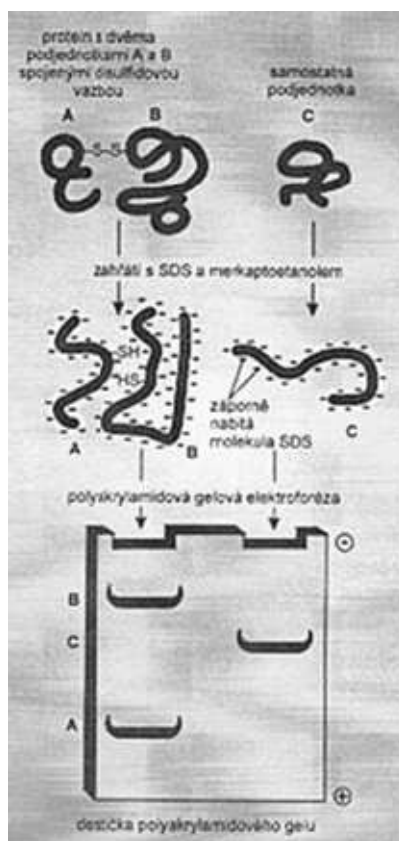
2.6.1. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

Principem této techniky je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nosičem je polyakrylamidový gel, který tvoří strukturu s póry. Velikost proteinu se následně stanoví srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s rychlostí pohybu fragmentu o známé velikosti – marker. Proteiny lze po dokončení elektroforézy zviditelnit použitím nespecifických barviv (stříbro, coomassie briliantová modř), které obarví všechny proteiny daného vzorku. Protože je ale v normálním buněčném extraktu přítomno příliš mnoho proteinů, proteiny se při této nativní elektroforéze často překrývají a je obtížné získat jednoznačný závěr o proteinových profilech daného vzorku a zastoupení specifických proteinů. Dalším komplikujícím faktorem je fakt, že proteiny jsou po chemické stránce mnohem rozmanitější než nukleové kyseliny. Jejich pohyblivost gelem při nativní elektroforéze závisí na tvaru (globulární proteiny putují gelem rychleji než vláknité), na „hustotě náboje“ (tj. poměru velikosti k jednotce hmoty) a na velikosti (menší molekuly se pohybují rychleji než molekuly větší) (Šmarda *et al.*, 2005).

2.6.2. Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Při této variantě elektroforézy se proteiny před nanesením denaturují detergentem dodecylsírany sodného (SDS). Případné disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem (β -merkaptotanolem), takže se rozpadnou komplexy složené z více proteinů a denaturace se dokončí varem. Malé a negativně nabitě molekuly SDS obklopí makromolekulu proteinu a v důsledku jejich elektrostatického odpuzování dojde k natažení (denaturaci) proteinu (obr. 6).

Obrázek č. 6: Využití laurylsíranu sodného při denaturaci proteinů při SDS-PAGE
(Šmarda *et al.*, 2005):



Proto proteiny za přítomnosti SDS zaujímají obdobný tyčinkovitý tvar. Počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti a každý protein tak získává bez ohledu na svou velikost ekvivalentní hustotu náboje. O pohyblivosti proteinů v gelu při této technice tedy rozhoduje pouze jejich molekulová hmotnost (Šmarda *et al.*, 2005). Vlastní elektroforetická separace probíhá v diskontinuálním polyakrylamidovém gelu v deskovém vertikálním uspořádání. Účinnost SDS-PAGE pro stanovení molekulové hmotnosti závisí na velikosti pórů separačních gelů. Porozita gelu je určena podílem monomerů akrylamidu a *bis*-akrylamidu v celkovém množství obou typů monomerů. Dalšími parametry ovlivňujícími rozlišení proteinů je množství akrylamidu a *bis*-akrylamidu použitého v jednotlivých gelech (stacking, separation gel), hodnota pH pufrů a způsob přípravy vzorků.

Kromě stanovení molekulové hmotnosti je tato technika používána také pro analýzu čistoty proteinu, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, pro detekci proteinových modifikací, ale i v jiných aplikacích. Jedná se ale o metodu poměrně pracnou a mezi její nevýhody patří také práce s toxickým monomerm akrylamidu (Bárta *et al.*, 2010). Rozdělené proteiny lze zviditelnit nescificky (přímým obarvením v gelu) nebo specificky pomocí protilátek (Šmarda *et al.*, 2005). Po detekci hlízových proteinů je získán jejich odrůdově specifický SDS-PAGE profil, který vykazuje nejvýraznější variabilitu v oblasti 39-44 kDa (proteiny patatinového komplexu) a 4-25 kDa (inhibitory proteas). V patatinové oblasti může být zjištěn rozdílný počet pruhů, které reprezentují jednotlivé izoformy patatinu (Bártová *et al.*, 2009)

2.6.3. Automatická čipová elektroforéza Experion (Experion system, Bio-Rad Laboratories, USA)

Tato moderní analytická technika umožňuje separaci denaturovaných proteinů s výsledkem podobným klasické SDS-PAGE separaci. Na rozdíl od ní ale poskytuje řadu výhod: rychlost, jednoduchost a větší bezpečnost práce (odpadá zde práce s toxickými monomery akrylamidu při přípravě gelů). Pro stanovení molekulové hmotnosti a kvantifikaci proteinů postačuje malé množství vzorku a reagentů (Bárta *et al.*, 2009). Systém Experion vykazuje také přesnější a reprodukovatelnější výsledky a v případě některých proteinových dvojic s podobnou molekulovou hmotností může mít lepší rozlišení než tradiční SDS-PAGE (Bárta *et al.*, 2010).

2.6.4. Sloupcová chromatografie

Principem sloupcové chromatografie je rozdělení proteinových směsí do frakcí na základě jejich odlišné prostupnosti náplní chromatografické kolony. Rychlost, s jakou jednotlivé proteiny kolonou procházejí, závisí na jejich interakcích s náplní kolony. Podle typu těchto interakcí se rozlišuje iontoměničová, gelová a afinitní chromatografie.

Při iontoměničové chromatografii rozhoduje o prostupnosti kolonou elektrická interakce mezi náplní kolony (iontoměničem) a nabitými skupinami proteinů a lze ji ovlivňovat pH nebo iontovou silou roztoku.

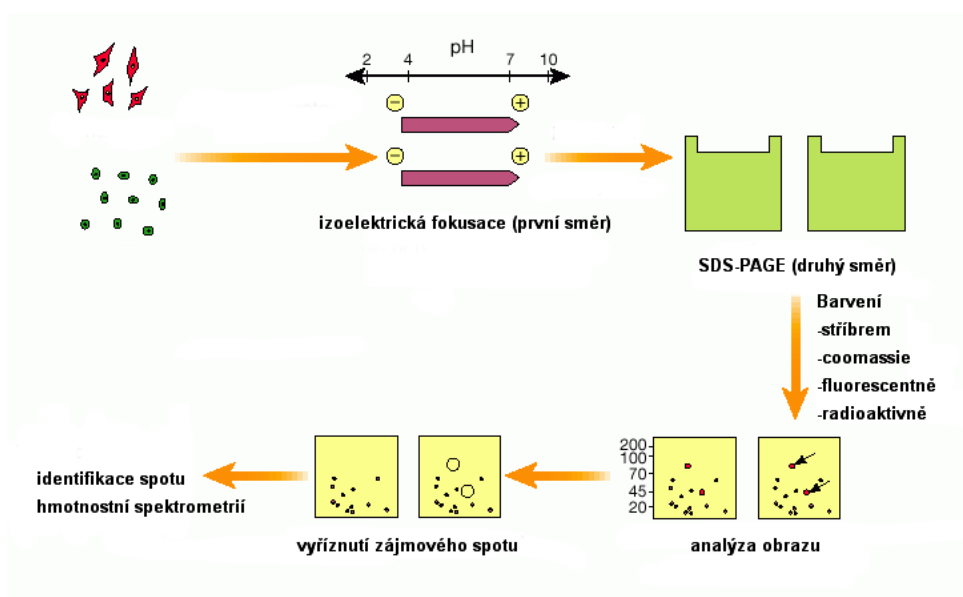
Při gelové chromatografii se náplň skládá z porézních zrněk. Proteiny s malou molekulovou hmotností do této náplně vstupují a jsou tak ve svém postupu kolonou zpomalovány. Proteiny o velké molekulové hmotnosti postupují kolonou rychleji, protože do náplně vstupovat nemohou.

Kolony afinitní chromatografie obsahují náplň s molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem. Většinou se využívá interakcí antigen/protilátka nebo enzym/substrát. Navázané proteiny z kolony lze uvolnit změnou pH nebo koncentrace promývacího (solného) roztoku. Touto chromatografií je možné získat zcela čisté proteiny (Šmarda *et al.*, 2005).

2.6.5. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (2D-PAGE)

Tato metoda v sobě zahrnuje v jednom směru izoelektrickou fokusaci (separace proteinů podle jejich izoelektrického bodu) a ve druhém směru SDS-PAGE, kdy se proteiny rozdělují podle své velikosti (Issaq, Veenstra, 2008).

Obrázek č. 7: Typické uspořádání 2D experimentu (Anonymus 3):



Principem izoelektrické fokusace je aplikace elektrického pole napříč stabilním gradientem pH. Všechny proteiny jsou typické svým izoelektrickým bodem (pI). Ten představuje takové pH, při kterém nemají proteiny ani pozitivní ani negativní náboj. Při vyšších hodnotách pH nese protein negativní náboj a naopak. Negativně nabité proteiny se pak v gradientu pH pohybují ke kladně nabitě elektrodě tak dlouho, dokud nedosáhnou takového pH, které odpovídá jeho pI. Výsledkem tohoto procesu je „zaostření“ každého proteinu do specifického bodu gradientu pH.

Dvourozměrná elektroforéza poskytuje soubor určitým způsobem uspořádaných proteinových skvrn, které se mohou porovnat s jinými soubory a tím např. identifikovat proteiny přítomné v jedné tkáni a ne ve druhé, nebo proteiny syntetizující se v různé míře podle změn v okolních podmínkách nebo podle fáze růstu.

Nevýhodou této techniky je fakt, že jeden protein může zaujímat na dvourozměrném gelu odlišné polohy a to např. v důsledku rozdílných posttranslačních modifikací, což může komplikovat interpretaci výsledků (Šmarda *et al.*, 2005). 2D-PAGE je také limitována svou neschopností rozdělit proteiny příliš kyselé nebo zásadité nebo příliš velké a malé (Issaq, Veenstra, 2008).

Dvourozměrnou elektroforézou lze rozdělit až 10 000 proteinových skvrn. (Šmarda *et al.*, 2005).

3. Cíle práce

Cílem práce bylo studium spektra proteinů ve slupkách a korových vrstvách hlíz bramboru a zjištění rozdílů v těchto spektrech mezi odrůdami, hlízami v různém stupni zralosti a při různém zdravotním stavu.

Díličí cíle představovaly:

- stanovení obsahu sušiny v hlízách
- kvantifikaci proteinů v sušině hlíz
- analýzu hlízových proteinů v pletivech hlíz elektroforetickými technikami
- detekci a hodnocení spekter izoenzymů s lipidacylhydrolázovou a peroxidázovou aktivitou
- detailní analýzu vybraných vzorků pomocí dvourozměrné elektroforézy

4. Materiál a metody

4.1. Pěstování materiálu a příprava vzorků

Pro tuto práci byly vybrány 2 odrůdy – Valfi, jako zástupce hlíz citlivých k napadení obecnou strupovitostí, a odolnější Vlasta. Brambory byly vysazeny kvůli nepříznivému počasí až 24.5.2010, a to na 2 pozemky v obci Vyklantice. Na prvním pozemku je výskyt obecné strupovitosti silný a pravidelný, na druhém se strupovitost nevyskytuje. Přílohy č. 1 a 2 ukazují průměrné teploty a srážky v této oblasti a vlastnosti půdy. Odběr vzorků pak probíhal ve dvou fázích – 11.8.2010 (vzorky označené jako X – nezralé hlízy) a 15.9.2010 (vzorky s označením Y – zralé hlízy).

Od každé odrůdy bylo pro analýzy vždy použito 15 zdravých hlíz a 15 hlíz napadených obecnou strupovitostí, a to ve dvou variantách (X/Y hlízy).

Z těchto vybraných hlíz byla odebrána slupka, korová vrstva a celý plátek charakterizující celý profil hlízy. Vzorky byly v dózách se známou hmotností zváženy, lyofilizovány, znovu zváženy a následně namlety na jemný prášek.

4.1.1. Odrůda Vlasta

Vlasta je poloraná odrůda určená k přímému konzumu. Registrovaná byla v roce 2009. Má krátce oválné, středně velké hlízy se žlutou slupkou i dužninou. Je zařazena do skupiny varného typu B. Vařené hlízy jsou středně pevné konzistence, středně moučnaté, po uvaření slabě tmavou. Tato odrůda je rezistentní proti napadení rakovinou bramboru (*Synchytrium endobioticum*, patotyp 1) a proti háďátku bramborovému (*Globodera rostochiensis*, patotyp Ro1). Je velmi dobře odolná obecné strupovitosti a méně odolná je vůči napadení plísní bramboru (*Phytophthora infestans*) na natí. Odrůda Vlasta se vyznačuje středně vysokým výnosem hlíz. Udržovatelem odrůdy je Vesa Velhartice a.s. (Čermák, 2010).

4.1.2. Odrůda Valfi

Jedná se o polopozdní až pozdní konzumní odrůdu. Registrovaná byla v roce 2005 (Čermák, 2010). Hlízy jsou oválné, středně velké až velké, s modrofialovou slupkou i dužninou.

Obrázek č. 8: Odrůda Valfi (Anonymus 4):



Odrůda Valfi patří do skupiny brambor s varným typem BC. Je náchylná vůči plísni bramborové v nati, středně až méně odolná obecné strupovitosti a středně odolná k mechanickému poškození. Díky svému zbarvení může být použita pro barevné zpestření jídel (barevné přílohy, saláty) a na výrobu smažených hranolků. Anthokyany v hlízách, které zbarvení způsobují, se vyznačují antioxidační aktivitou (Anonymus 4, 2010).

4.2. Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny v hlízách byl stanoven gravimetricky. Každý vzorek byl na předvážkách zvážen vždy v čerstvém stavu a po lyofilizaci. Z rozdílu hodnot před a po vysušení byl získán obsah sušiny v hlízách.

4.3. Stanovení obsahu proteinů v sušině bramborových hlíz

4.3.1. Extrakce proteinů

K zaznamenanému množství vzorku (cca 50 mg) bylo v případě slupek přidáno 5 ml NaOH (0,5 M) a ke korovým vrstvám a celoprofilovým vzorkům bylo přidáno 10 ml NaOH (0,5 M). Extrakce probíhala 120 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci (4500 rpm, 10 minut, pokojová teplota) bylo 500 ml vzorku přepipetováno do jiných zkumavek a uchováváno při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2. Stanovení obsahu proteinů v sušině hlíz

Pro stanovení proteinů v sušině byl použit Coomassie plus – the Better Bradford™ Kit (Pierce). Jedná se kolorimetrickou kvantifikaci proteinů, jejímž principem je vazba Coomassie barviva na molekulu proteinů za změny hnědé barvy na modrou (příloha č. 3). Metoda dokáže stanovit koncentraci proteinů ve vzorku od 100 do 1500 $\mu\text{g/ml}$. Při přípravě vzorků i standardů pro vytvoření kalibrační křivky bylo postupováno podle přiloženého návodu výrobce.

4.4. Elektroforetické stanovení hlízových proteinů

4.4.1. Automatická čipová elektroforéza Experion (Experion system, Bio-Rad laboratories)

Pro analýzu slupek brambor bylo naváženo 50 mg vzorku, v případě korových pletiv a celoprofilového vzorku bylo naváženo 100 mg. K navážce byl přidán 1 ml extrakčního pufru (0,0625M Tris-HCl (pH=6,8) + 2 % SDS) s 5 % β -merkaptoetanolu. Zkumavky byly zvortexovány a následná extrakce proteinů probíhala na ledu po dobu 3,5 h. Po centrifugaci (4500 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minut) byly vzorky přepipetovány do čistých a propíchnutých zkumavek a 3 minuty se vařily. Uchovávány byly při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analýza proteinů byla provedena pomocí soupravy Experion™ Pro260 Analysis Kit. Postupováno bylo podle návodu výrobce.

4.4.2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Extrakce proteinů byla provedena stejně jako u čipové elektroforézy. Separace proteinů pak probíhala na polyakrylamidovém gelu (složení gelu v tab. 3).

Tabulka č. 3: Složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE:

	separační gel (10%)	zaostřovací gel (3,75%)
H ₂ O	42 ml	12,15 ml
AC/BIS (37,5:1; AppliChem)	26,6 ml	2,50 ml
Pufř A	10 ml	-
Pufř B	-	5 ml
SDS	800 µl	200 µl
Sifičitan sodný	60 µl	20 µl
Persíran amonný (15%)	400 µl	150 µl
TEMED (Sigma-Aldrich)	40 µl	20 µl

20 µl vzorku korových pletiv a celých profilů hlíz bylo smícháno s 20 µl vody a 10 µl nanášecího pufru. U slupek se smíchalo 40 µl vzorku a 10 µl nanášecího pufru. Poté bylo na gel nanášeno vždy 10 µl této směsi. Stejně bylo postupováno i při nanášení hmotnostního markeru (Sigma-Aldrich). Elektroforéza probíhala při 120 V po dobu 4 hodin v prostředí vanového pufru. Po skončení elektroforézy byl gel umístěn přes noc na třepačku do pufru s Comassie barvivem a pak na 4 h na třepačku do odbarvovacího roztoku. Následně byl gel ponechán přes noc ve vodě a pak 2 h ve fixačním roztoku – bez třepání. Nakonec se gel nechal minimálně 5 dní sušit, aby se mohl skladovat. Složení jednotlivých pufrů a roztoků je uvedeno v příloze č. 4.

4.4.3. Chromatografická purifikace patatinu pro dvourozměrnou elektroforézu

Extrakce proteinů

Pro detekci proteinů dvourozměrnou elektroforézou byly použity pouze slupky nezralých hlíz odrůdy Valfi. K 500 mg vzorku byly přidány 2 ml extrakčního pufru (25 mM Tris-HCl). Extrakce probíhala 30 minut na ledu. Extrakt proteinů byl následně centrifugován (4500 rpm, 4 °C, 20 minut) a přefiltrován. Poté bylo upraveno pH na 7,4 pomocí 1 M Tris.

Purifikace proteinů

A/ Iontovýměnná chromatografie s náplní DEAE 52 – Cellulose Servacel (Serva)

- ekvilibrace chromatografických kolonek startovacím puftrem (25 mM Tris-HCl, pH 7.4)
- nanesení 2 ml extraktu na kolonky s mediem – frakce plněna do dóz s označením B
- odebrání 200 µl z dózy B pro pozdější elektroforetickou kontrolu purifikačního procesu
- promytí kolonek celkem 40 ml startovacího pufru – prvních 15 ml plněno do dóz B
- isokratická eluce navázaných proteinů 20 ml elučního pufru (25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 + 100 ml NaCl, doplněno do litru vodou) – frakce plněna do dóz s označením C
- odebrání 200 µl z dózy C pro pozdější elektroforetickou kontrolu purifikačního procesu
- regenerace kolonek 15 ml 1 M NaOH přes noc
- promytí a ekvilibrace kolonek startovacím puftrem dokud není na výtoku hodnota pH 7,4

B/ Chromatografie v kolonách s náplní Con A Sepharose 4B (Amersham Biosciences)

- ekvilibrace kolon – 25 ml startovacího pufru (25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 + 100 ml NaCl, doplněno do litru vodou) promícháno skleněnou tyčinkou s mediem v koloně
- 2. ekvilibrace kolony – 35 ml startovacího pufru promícháno s mediem
- nanesení 15 ml vzorku (z dózy C z předchozí chromatografie) s pH upraveným na 7,4 (pomocí 1 M HCl) – při nanášení uzavřen kohout kolony na 10 minut, medium se vzorkem pomalu a řádně promíchá- plněno do dóz D
- odebrání 200 μ l z dózy D pro pozdější elektroforetickou kontrolu purifikačního procesu
- vymytí nenavázaných složek – 2 x 25 ml startovacího pufru
- isokratická eluce navázaných složek – 3 x 10 ml elučního pufru (25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 + 100 ml NaCl + 100 ml 1 M α -methyl-D-glucosid, doplněno do litru vodou) – první aplikace objemu pufru se zavřeným kohoutem kolony (10 minut), pokaždé promícháno s mediem- plněno do dóz E
- odebrání 300 μ l z dózy E pro pozdější elektroforetickou kontrolu purifikačního procesu
- 3x regenerace kolony
 - 20 ml bazického pufru – promíchání
 - 20 ml kyselého pufru – promíchání

Tabulka č. 4: Složení uchovávacího a regeneračních pufrů pro chromatografickou purifikaci patatinu

	Regenerační pufr kyselý	Regenerační pufr bazický	Uchovávací
1 M Na-acetát, pH 6,0	0	0	100
1 M Na-acetát, pH 4,5	50	0	0
1 M tris-HCl, pH 8,5	0	50	0
5 M NaCl	100	100	200
1M MnCl ₂	1	1	1
1 M CaCl ₂	1	1	1
1 M MgCl ₂	1	1	1
Ethanol abs.	0	0	200
dH ₂ O	848	848	497

Obsah všech dóz (B, C, D, E) byl následně lyofilizován a dózy byly uchovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vzorky byly dvakrát chromatograficky odsoleny na koloně Sephadex G-25 Medium (Amersham Biosciences). Postupováno bylo podle návodu výrobce. Odsolené vzorky byly pak přefiltrovány a zároveň vysterilizovány pomocí filtrů Millex-GV o velikosti pórů $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore).

4.4.4. Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (2D-PAGE)

Tato analýza probíhala ve specializované laboratoři Oddělení funkční genomiky a proteomiky rostlin na Ústavu experimentální biologie (Masarykova univerzita v Brně). Pro fokusaci bylo použito nelineárního stripu (7 cm dlouhý) s rozmezím pH 4,7-5,9. Nanáška vzorku byla $125\text{ }\mu\text{l}$. Následná SDS probíhala na 10% polyakrylamidovém gelu. Detekce pak byla provedena pomocí Coomassie barviva.

4.5. Detekce enzymových aktivit hlízových proteinů

4.5.1. Extrakce a elektroforetická separace proteinů (nativní PAGE)

K přibližně 50 mg vzorku bylo přidáno 500 μ l extrakčního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4). Extrakce probíhala 30 minut na ledu. Extrakty byly následně stočeny na centrifuze (4500 rpm, 4°C, 10 minut) a přepipetovány do čistých zkumavek. Uchovávány pak byly v -80 °C.

Proteiny byly rozděleny pomocí vertikální deskové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.

Tabulka č. 5: Složení polyakrylamidového gelu pro nativní PAGE:

dH ₂ O	40 ml
R1 pufr	15 ml
AC/BIS (30:0,8; AppliChem)	20 ml
Na ₂ SO ₃	60 μ l
TEMED (Sigma-Aldrich)	40 μ l
persíran amonný (15%)	400 μ l

Na gel bylo naneseno vždy 40 μ l vzorku s 10 μ l pufru. Elektroforéza probíhala v prostředí borátového vanového pufru (R1 pufr) při 120 V, po dobu cca 4 hodin. Složení jednotlivých pufrů a roztoků je uvedeno v příloze č. 4.

Pro stanovení jednotlivých enzymových aktivit byly pak gely barveny následujícími postupy.

4.5.2. Detekce lipidacylhydrolázové aktivity

Cca 15 minut před doběhnutím elektroforézy bylo do Erlenmayerovy baňky obalené alobalem naváženo 100 mg Fast Blue BB salt (Sigma-Aldrich). Dále bylo do kádinky napipetováno 50 μ l α -naftyl-butyátu, 5 ml acetonu a 5 ml vody.

Ke gelu bylo přidáno 100 ml 100 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4). Po krátkém působení byl pufr slit. Poté byl gel přemístěn do termostatu s 37°C. Do Erlenmayerovy

baňky s BBP byl přilít obsah kádinky. Po promíchání bylo k obsahu baňky přidáno 100 ml 100 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4). Takto připravená reakce byla z Erlenmayerovy baňky nalita na gel. Gel byl ponechán inkubaci do objevení pruhů (cca 5-30 minut). Po zviditelnění pruhů byl gel ponechán ve fixačním roztoku (příloha č. 4)

4.5.3. Detekce peroxidázové aktivity

Gel byl vložen do misky se 100 ml pufru (20,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ doplněno do 1 l vodou) a inkubován asi 5 minut ve tmě na třepačce. Poté byl do vaničky s gelem přidán roztok 7,5 ml vody s 50 mg dianisidinu. Po asi minutové inkubaci byl přidán 1,5 ml 3% H_2O_2 . V tomto prostředí byl gel ponechán, dokud se neobjevily hnědé pruhy. Následovala dvouhodinová konzervace gelu ve fixačním roztoku (příloha č. 4) a nakonec vysušení gelu.

4.6. Zpracování dat

Data obsahu sušiny, obsahu bílkovin a zastoupení patatinu v celkovém proteinu (relativní abundance patatinu) byla zpracována prostřednictvím vícefaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pomocí programu STATISTICA 6 (StatSoft, USA). Profily proteinů získané elektroforetickými analýzami byla vyhodnocena pomocí programu BioProfil Bio1D++, verze 99 (Vilber Lourmat, Francie).

4. Výsledky

4.1. Stanovení obsahu sušiny a proteinů v sušině hlíz

4.1.1. Průměrná hmotnost hlíz

Průměrná hmotnost 15 hlíz se pohybovala od 41,43 do 89,6 g (tab. 6). Hlízy odrůdy Vlasta byly spíše menší než hlízy odrůdy Valfi.

Tabulka č. 6: Průměrné hmotnosti hlíz jednotlivých odrůd v gramech

	nezralé hlízy		zralé hlízy	
	zdravé	napadené	zdravé	napadené
Valfi	48,8	42,5	89,6	87,7
Vlasta	41,4	58,3	61,5	67,9

4.1.2. Obsah sušiny v hlízách

Největší rozmezí obsahu sušiny bylo zjištěno u napadených hlíz odrůdy Vlasta. Obsah sušiny v těchto hlízách byl nejméně 14,8 % naměřených v korových pletivech nezralých hlíz a maximálně 25,4 % zjištěných ve slupkách zralých hlíz. Hodnoty ostatních variant se pohybovaly v tomto intervalu hodnot.

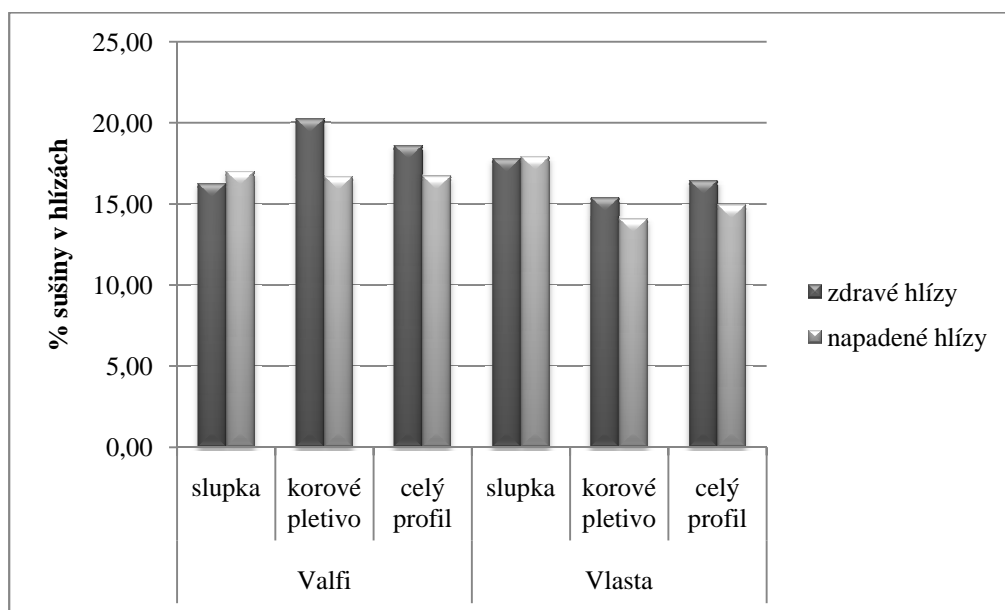
Podle výsledků stanovení sušiny v celých profilech zdravých zralých hlíz byl průměrný obsah sušiny 20,5 % (Vlasta) a 21,2 % (Valfi). V případě napadených se obsah sušiny pohyboval okolo 20,6 % u obou odrůd. V nezralých hlízách pak bylo toto rozmezí 15 % (Vlasta) až 16,7 % (Valfi) v napadených hlízách, ve zdravých hlízách 16,4 % (Vlasta) až 18,6 % (Valfi). Napadené hlízy odrůdy Valfi obsahovaly sušiny méně než hlízy zdravé (zralé i nezralé). U hlíz odrůdy Vlasta tomu bylo v případě nezralých hlíz stejně, jen ve zralých hlízách této odrůdy se obsah sušiny příliš nelišil. Podle údajů obsahu sušiny v celých profilech (tedy bez slupky) obsahovala méně sušiny odrůda Vlasta.

Odrůda Vlasta obsahovala vždy více sušiny ve slupkách než v korovém pletivu. U odrůdy Valfi tomu bylo s výjimkou nezralých napadených hlíz naopak. Na obrázcích č. 9 a 10 je také vidět, že zatímco v nezralých hlízách k výrazným rozdílům ve slupkách

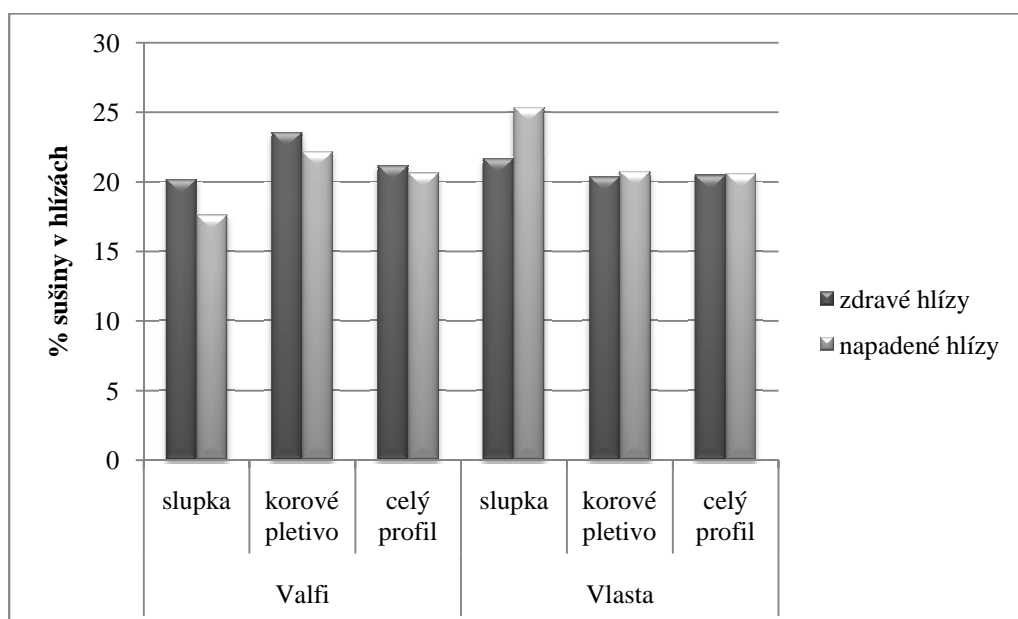
napadených a zdravých hlíz nedošlo, u zralých hlíz jsou už rozdíly mezi těmito variantami u obou odrůd patrnější.

Obsah sušiny v jednotlivých vzorcích je uveden v příloze č. 5. Data z hodnocení statistické průkaznosti vlivů jednotlivých faktorů na obsah sušiny jsou uvedena v tabulce č. 7.

Obrázek č. 9: Obsah sušiny v nezralých hlízách



Obrázek č. 10: Obsah sušiny ve zralých hlízách



Tabulka č. 7: Hodnocení statistické průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů na obsah sušiny pomocí ANOVA testu

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	17070,09	1	17070,09	10722,60	0,000000
odrůda (1)	2,99	1	2,99	1,88	0,183196
stupeň zralosti (2)	218,46	1	218,46	137,23	0,000000
napadení (3)	6,58	1	6,58	4,13	0,053330
vrstva pletiva (4)	3,48	2	1,74	1,09	0,351369
1 x 2	11,47	1	11,47	7,21	0,012951
1 x 3	7,23	1	7,23	4,54	0,043474
2 x 3	6,20	1	6,20	3,90	0,059974
1 x 4	78,04	2	39,02	24,51	0,000002
2 x 4	1,43	2	0,71	0,45	0,643513
3 x 4	9,54	2	4,77	3,00	0,068981
1 x 2 x 3	2,14	1	2,14	1,35	0,257362
1 x 2 x 4	3,17	2	1,58	0,99	0,384764
1 x 3 x 4	3,29	2	1,65	1,03	0,370746
2 x 3 x 4	2,63	2	1,32	0,83	0,449375
1 x 2 x 3 x 4	10,70	2	5,35	3,36	0,051730
Error	38,21	24	1,59		

Pozn.: tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné

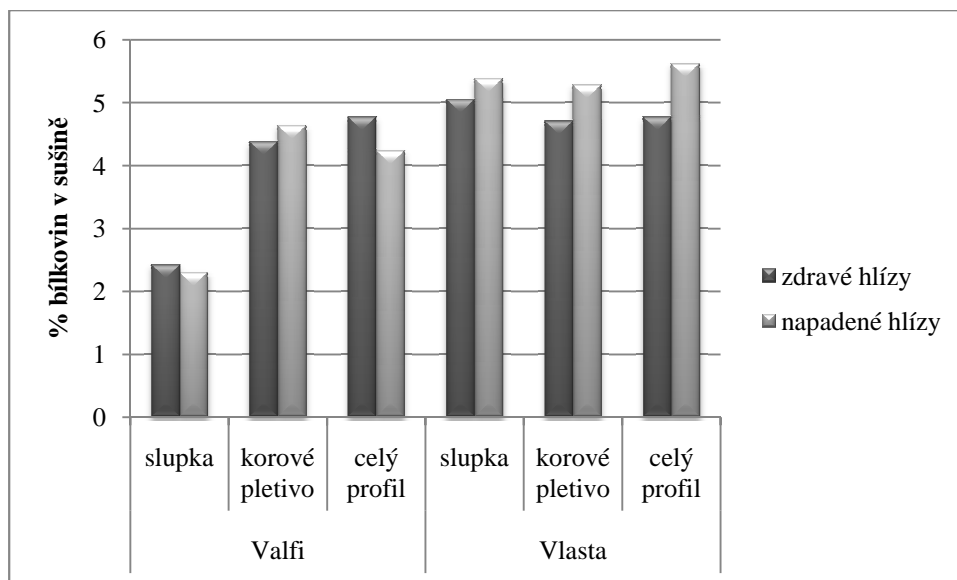
4.1.3. Kvantifikace proteinů v sušině hlíz

Zastoupení proteinů se pohybovalo u nezralých hlíz od 2,3 % (slupka napadených hlíz odrůdy Valfi) do 5,6 % (celý profil napadených hlíz odrůdy Vlasta). Ve zralých hlízách to bylo 3,5 % (celý profil zdravých hlíz odrůdy Valfi) až 8,2 % (slupky napadených hlíz odrůdy Valfi).

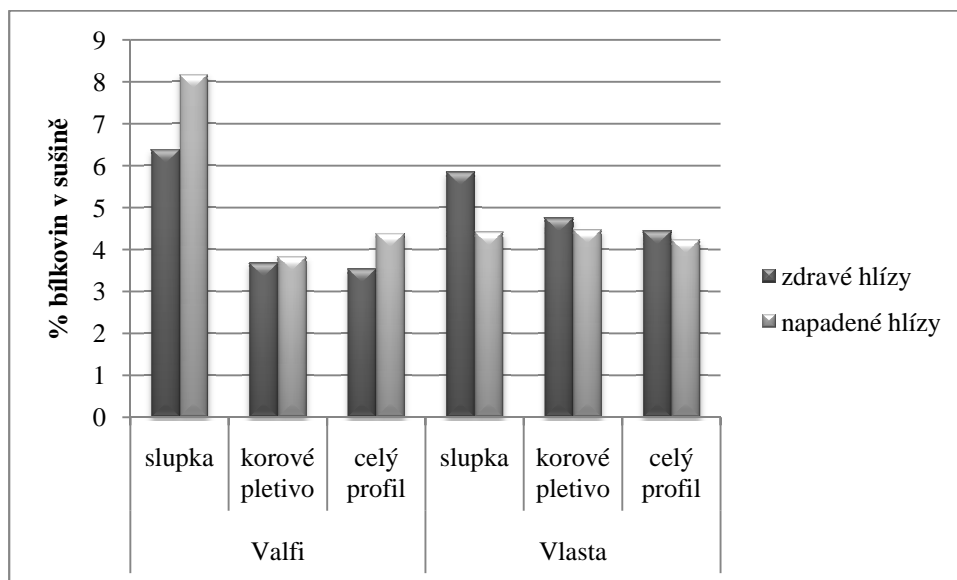
Jak ukazují obrázky č. 11 a 12, výrazné rozdíly lze zaznamenat mezi slupkami obou odrůd. Nezralé hlízy odrůdy Vlasta (zdravé i napadené) obsahovaly ve slupkách výrazně více proteinů než odrůda Valfi. U zralých hlíz tomu bylo naopak a navíc zde byl zaznamenán i patrný rozdíl mezi zdravými a napadenými hlízami. Napadené hlízy odrůdy Valfi obsahovaly proteinů více než zdravé, zatímco u odrůdy Vlasta došlo zřejmě vlivem napadení obecnou strupovitostí k poklesu množství proteinů.

Obsah proteinů v jednotlivých vzorcích je uveden v příloze č. 6. Data získaná statistickým vyhodnocením jsou uvedena v tabulce č. 8.

Obrázek č. 11: Obsah proteinů v sušině nezralých hlíz



Obrázek č. 12: Obsah proteinů v sušině zralých hlíz



Tabulka č. 8: Hodnocení statistické průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů na obsah proteinů v sušině pomocí ANOVA testu:

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1038,531	1	1038,531	6363,467	0,000000
odrůda (1)	3,260	1	3,260	19,978	0,000160
stupeň zralosti (2)	1,767	1	1,767	10,828	0,003082
napadení (3)	0,416	1	0,416	2,551	0,123335
vrstva pletiva (4)	2,849	2	1,425	8,730	0,001416
1 x 2	8,225	1	8,225	50,400	0,000000
1 x 3	0,557	1	0,557	3,412	0,077087
2 x 3	0,022	1	0,022	0,135	0,716095
1 x 4	0,209	2	0,104	0,639	0,536658
2 x 4	24,758	2	12,379	75,850	0,000000
3 x 4	0,023	2	0,012	0,071	0,931195
1 x 2 x 3	3,916	1	3,916	23,994	0,000054
1 x 2 x 4	17,049	2	8,524	52,232	0,000000
1 x 3 x 4	1,383	2	0,691	4,236	0,026569
2 x 3 x 4	0,242	2	0,121	0,743	0,486472
1 x 2 x 3 x 4	1,069	2	0,534	3,275	0,055257
Error	3,917	24	0,163		

Pozn.: tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné

4.2. Hodnocení profilu proteinových spekter pomocí SDS-PAGE

Pomocí SDS-PAGE byly získány profily proteinů v jednotlivých vzorcích. Gely byly následně vyhodnoceny v programu BioProfil Bio1D++ (verze 99, Vilber Lourmat, Francie) a byly tak zjištěny molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů a jejich relativní zastoupení ve vzorku.

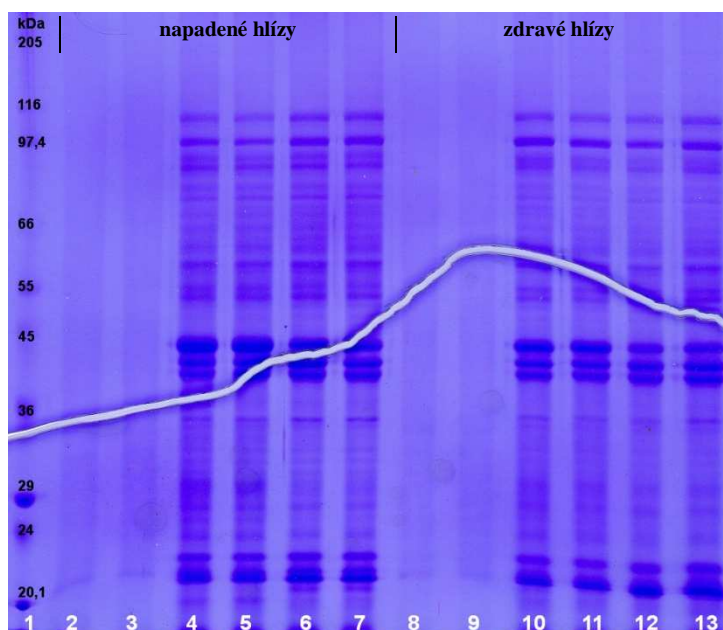
Mezi profily proteinů v jednotlivých vrstvách hlíz jsou u obou odrůd zcela zásadní rozdíly (obrázky č. 13 až 16). Výrazná variabilita byla zjištěna zvláště mezi slupkou a vnitřními pletivy. Ve slupkách hlíz je proteinů vždy nejméně. Mezi zdravými a napadenými hlízami byly rozdíly zejména v intenzitě pruhů a jejich detekovatelnosti.

Odrůda Valfi

Ve slupkách nezralých hlíz odrůdy Valfi (obr. 13) byl nalezen pouze protein o molekulové hmotnosti 20,4 kDa. V napadených hlízách bylo zaznamenáno 21 výraznějších pruhů (korové pletivo) a 18 pruhů (celý profil). Ve zdravých hlízách to bylo 13 pruhů v korovém pletivu a 10 v celém profilu hlíz. Nejvýraznější zde byly 3 skupiny pruhů v oblastech okolo 111 kDa, 39-43 kDa (patatin) a 20,4-21,3 kDa.

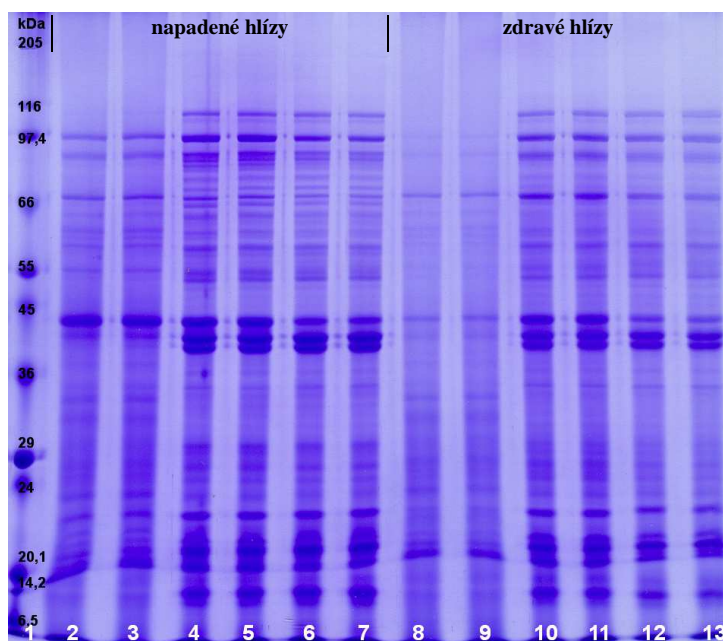
Ve zralých hlízách odrůdy Valfi (obr. 14) je pruhů více než v hlízách nezralých. V těchto hlízách jsou také rozdíly v zastoupení a množství proteinů mezi napadenými a zdravými hlízami, zejména v oblasti slupky, patrnější. Oblast 37-50 kDa – proteiny patatinového komplexu – byla po předchozí chromatografické purifikaci detailněji analyzována pomocí dvourozměrné elektroforézy. Ve slupkách je možné vidět 2 pruhy v oblasti 43 kDa (výrazně silnější) a 40,4 kDa – u zdravých hlíz jsou ale pruhy méně výrazné. Další variabilitu je možné vidět v oblasti proteinů s molekulovou hmotností 23-26,6 kDa, kdy ve zdravých hlízách jeden pruh chybí a ostatní jsou méně znatelné. Třetí výraznou změnu mezi hlízami s odlišným zdravotním stavem je možné zaznamenat v oblasti 96 a 85 kDa. V napadených hlízách je tato proteinová oblast výrazně silnější. Méně detekovatelných pruhů můžeme zaznamenat ve vnitřních pletivech zralých zdravých hlíz: u napadených hlíz byl počet pruhů 28 v korovém pletivu, 27 v celém profilu, u zdravých pak 21 v korovém pletivu a 15 v celých profilech.

Obrázek č. 13: Odrůda Valfi, nezralé hlízy – hlízové proteiny na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE):



- 1 – marker
- 2,3 – slupka
- 4,5 – korové pletivo
- 6,7 – celý profil
- 8,9 – slupka
- 10,11 – korové pletivo
- 12,13 – celý profil

Obrázek č. 14: Odrůda Valfi, zralé hlízy – hlízové proteiny na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE):



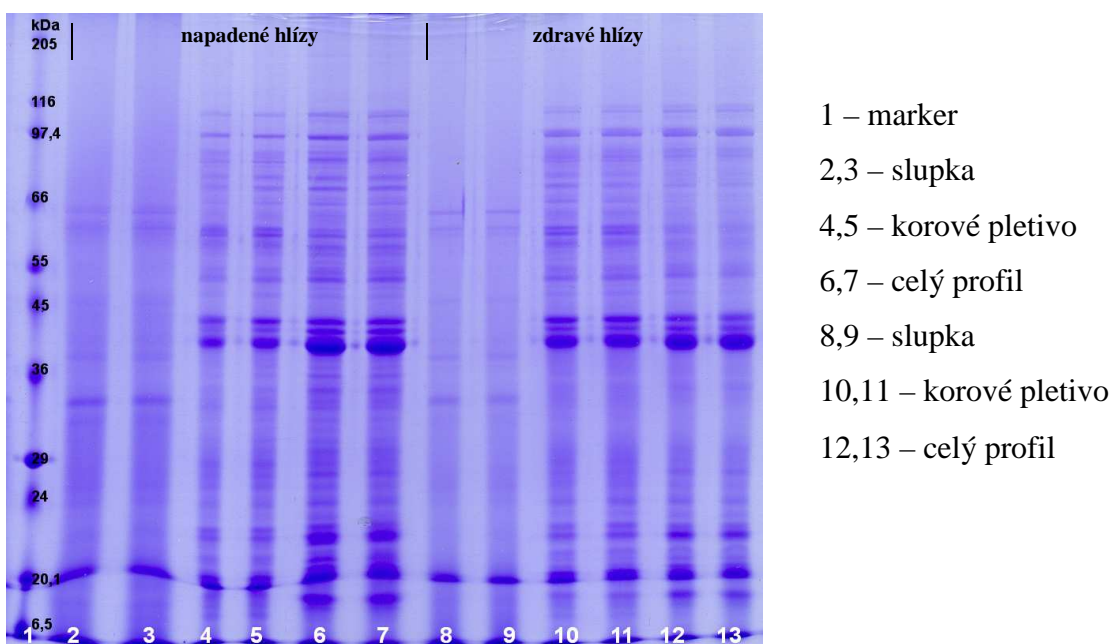
- 1 – marker
- 2,3 – slupka
- 4,5 – korové pletivo
- 6,7 – celý profil
- 8,9 – slupka
- 10,11 – korové pletivo
- 12,13 – celý profil

Odrůda Vlasta

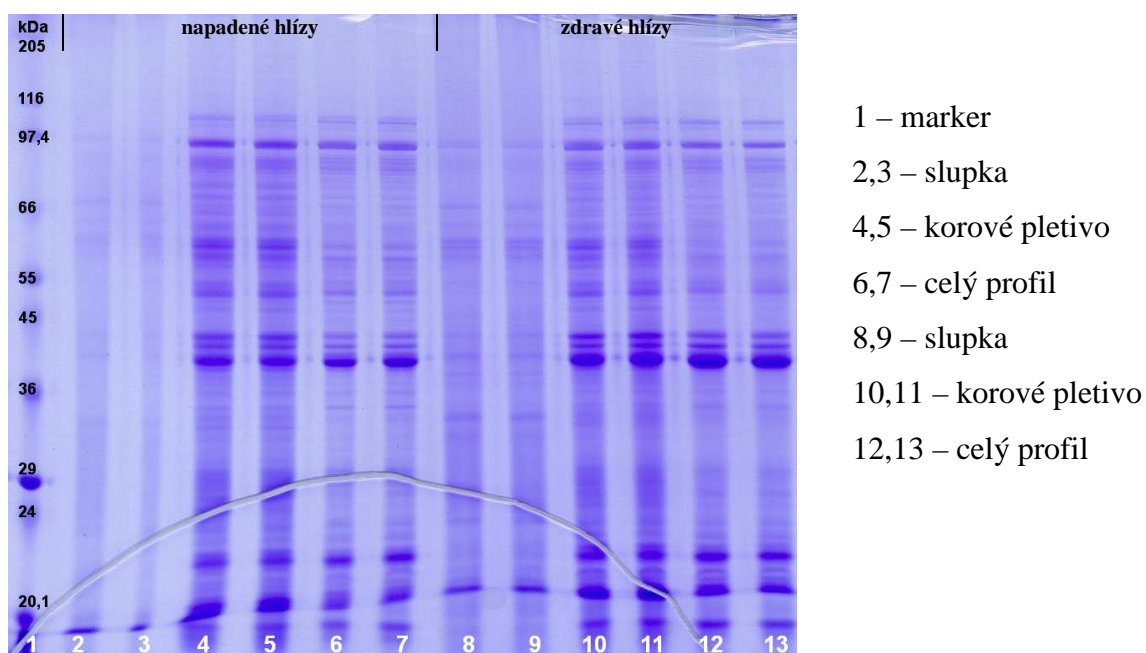
Ve slupkách nezralých hlíz odrůdy Vlasta (obr. 15) byl nejvýraznější protein v oblasti 20,3 kDa. Dále se zde nachází 4 pruhy rozptýlené po celé dráze daného vzorku. Tyto pruhy dosahují molekulových hmotností 65, 63, 38 a 34,5 kDa u zdravých i napadených hlíz. Zatímco v nezralých zdravých hlízách odrůdy Valfi je ve vnitřních pletivech méně pruhů než v napadených, u hlíz odrůdy Vlasta je ve zdravých hlízách méně pruhů jen na úrovni celých profilů (oproti 23 pruhům v napadených hlízách jich mají tyto hlízy 17). Naopak v korovém pletivu je pruhů 19 (oproti 15 pruhům v napadených hlízách).

Ve slupkách zralých hlíz této odrůdy (obr. 16) je také nejvýraznější jediný pruh s molekulovou hmotností 21,7 kDa (hlízy napadené) a 26,6 kDa (zdravé hlízy). Na rozdíl od nezralých hlíz je zde možné rozeznat proteiny s molekulovou hmotností 114,3 kDa. Slabý pruh můžeme vidět i v oblasti patatinu na úrovni 52 a 48 kDa. U zdravých hlíz, kde je celkově pruhů více (i v porovnání s nezralými hlízami), jsou pruhy výraznější.

Obrázek č. 15: Odrůda Vlasta, nezralé hlízy – hlízové proteiny na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE):



Obrázek č. 16: Odrůda Vlasta, zralé hlízy – hlízové proteiny na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE):



Přítomnost 3 proteinových izoform v patatinové oblasti byla detekována ve všech vnitřních pletivech. Zastoupení těchto proteinů se zde pohybovalo od 34,2 % (korové pletivo zralých napadených hlíz odrůdy Valfi) do 69,4 % (celý profil nezralých zdravých hlíz odrůdy Vlasta) (tabulka č. 9). V průběhu zrání se podle mých výsledků relativní zastoupení proteinů patatinové zóny v celém proteinovém spektru hlíz spíše snižovalo. Molekulová hmotnost proteinů se pohybovala mezi 38 a 43 kDa u odrůdy Valfi. V nezralých hlízách odrůdy Vlasta byl tento interval od 40 do 44 kDa a ve zralých hlízách pak tyto proteinové izoformy dosahovaly molekulových hmotností vyšších – 47 až 52 kDa. Ve slupkách byla tato proteinová oblast zaznamenána pouze u slupek zralých hlíz (2 izoformy). Ve vnitřních pletivech hlíz odrůdy Valfi byly všechny 3 pruhy v této oblasti silné, u odrůdy Vlasta byl nejsilnější pruh s nejmenší molekulovou hmotností.

V oblasti inhibitorů proteáz (17-26 kDa) bylo ve vnitřních pletivech hlíz nalezeno 3-5 pruhů (Valfi) a 1-6 pruhů (Vlasta).

Podle statistického hodnocení byl prokázán přímý vliv odrůdy a jednotlivé vrstvy hlíz na zastoupení patatinových proteinů v celkovém proteinovém profilu (tab. č. 10).

Tabulka č. 9: Průměrné relativní zastoupení proteinů v oblasti 38-52 kDa v celém proteinovém profilu (%):

	napadené hlízy			zdravé hlízy		
	slupka	korové pletivo	celý profil	slupka	korové pletivo	celý profil
Valfi nezralé	N	41,8	47,2	N	43,1	43,2
Valfi zralé	35,7	34,2	41,6	N	36,6	42,0
Vlasta nezralé	N	61,4	61,9	N	58,7	69,4
Vlasta zralé	N	39,8	42,7	N	51,6	45,2

N= nehodnoceno pro příliš malé množství proteinu

Tabulka č. 10: Hodnocení statistické průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů na relativní zastoupení proteinů patatinové oblasti pomocí ANOVA testu:

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	50090,71	1	50090,71	889,4460	0,000000
odrůda (1)	622,48	1	622,48	11,0533	0,002836
stupeň zralosti (2)	109,46	1	109,46	1,9436	0,176053
napadení (3)	1,58	1	1,58	0,0281	0,868181
vrstva pletiva (4)	18879,63	2	9439,82	167,6201	0,000000
1 x 2	968,24	1	968,24	17,1928	0,000364
1 x 3	96,17	1	96,17	1,7077	0,203662
2 x 3	144,06	1	144,06	2,5580	0,122817
1 x 4	1684,43	2	842,21	14,9549	0,000061
2 x 4	954,24	2	477,12	8,4720	0,001645
3 x 4	609,21	2	304,60	5,4088	0,011507
1 x 2 x 3	305,54	1	305,54	5,4253	0,028590
1 x 2 x 4	0,20	2	0,10	0,0018	0,998219
1 x 3 x 4	326,75	2	163,38	2,9010	0,074401
2 x 3 x 4	181,48	2	90,74	1,6113	0,220492
1 x 2 x 3 x 4	329,32	2	164,66	2,9238	0,073047
Error	1351,60	24	56,32		

Pozn.: tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné

4.3. Hodnocení izoenzymových spekter po nativní PAGE

Elektroforetickou separací a následnou detekcí enzymových aktivit na gelu byla vizualizována aktivita lipidacylhydrolázy (LAH) a peroxidázová aktivita. Získané biochemické informace byly následně vyhodnoceny, stejně jako profily proteinů získané SDS-PAGE, v programu BioProfil. Největší rozdíly bylo na gelech možné zaznamenat mezi odrůdami, dále mezi pletivem slupky a vnitřními pletivy. V rámci dalších parametrů (zdravotní stav a stupeň zralosti) byly rozdíly nejméně výrazné.

4.3.1. Aktivita lipidacylhydrolázy

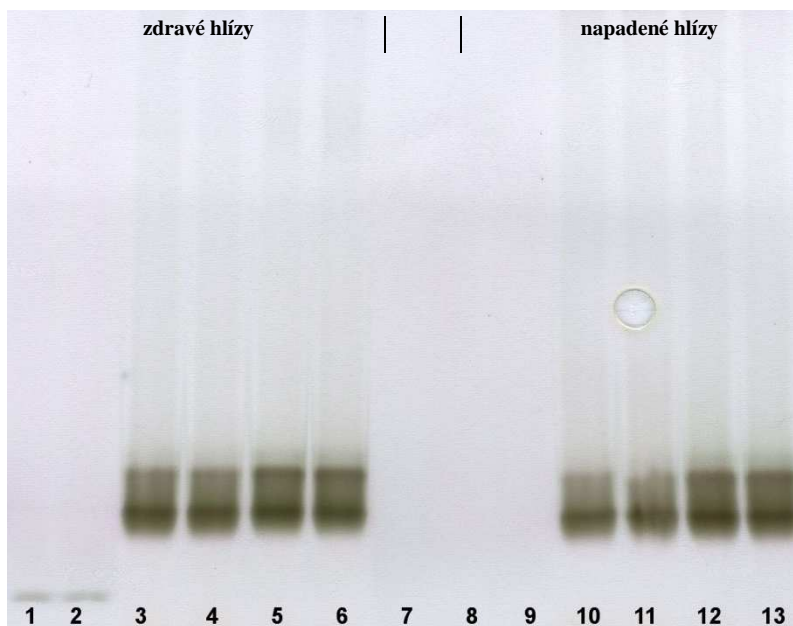
LAH aktivita byla zachycena v korových pletivech a celoprofilových vzorcích zralých i nezralých hlíz obou odrůd. Ve slupkách byla zaznamenána pouze u odrůdy Valfi, a to v podobě slabých pruhů.

Odrůda Valfi

Ve slupkách nezralých hlíz odrůdy Valfi (obr. č. 17) byl detekován izoenzym s relativní mobilitou (dále Rf) 0,97. Ten se ale u napadených hlíz už neobjevuje a vlivem zrání jeho intenzita slábne. Na obrázku je také vidět v korových pletivech zdravých hlíz skupinu 2 pruhů. Podle hodnot Rf (0,74 a 0,81) jsou na stejné úrovni s pruhy celých profilů hlíz. Zřejmě vlivem napadení došlo v korových pletivech ke ztrátě první z izoform. U celých profilů rozdíly mezi zdravými a napadenými hlízami patrné nejsou.

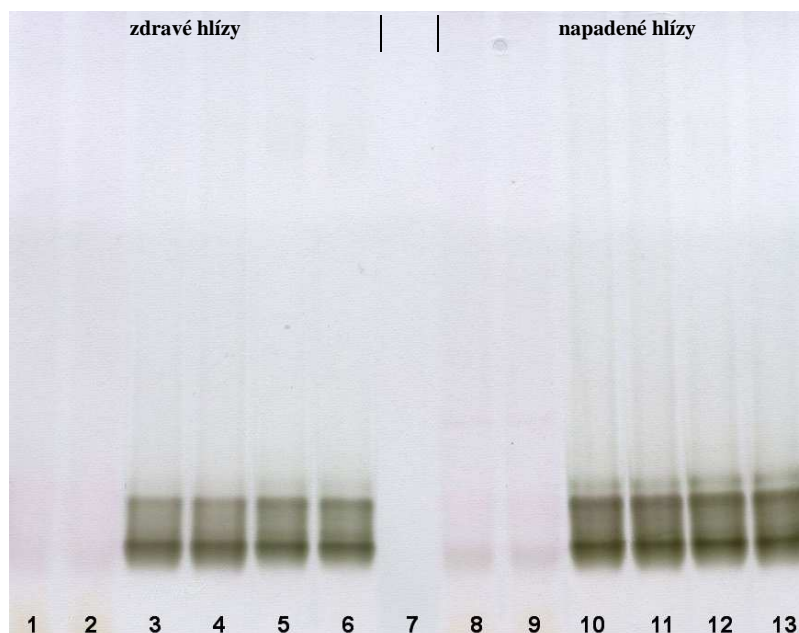
U zralých hlíz odrůdy Valfi (obr. č. 18) se v korových pletivech a celých profilech hlíz objevil na gelu třetí pruh s relativní mobilitou 0,77. Patrně vlivem napadení zde došlo ke zdatnému zvýšení intenzity LAH aktivity u všech tří izoform. Jak je tedy patrné z těchto gelů, pruhy LAH aktivity ve vnitřních pletivech odrůdy Valfi během zrání hlíz zeslábly (lépe je to zdatné u hlíz zdravých), zatímco se u některých variant objevily nové izoformy (hlízy zdravé). V oblasti slupek se naopak během zrání slabé pruhy naznačující tuto aktivitu objevily.

Obrázek 17: Odrůda Valfi, nezralé hlízy – LAH aktivita na gelu (nativní PAGE):



- 1,2 – slupka
- 3,4 – korové pletivo
- 5,6 – celý profil
- 7 – mezera
- 8,9 – slupka
- 10,11 – korové pletivo
- 12,13 – celý profil

Obrázek č. 18: Odrůda Valfi, zralé hlízy – LAH aktivita na gelu (nativní PAGE):



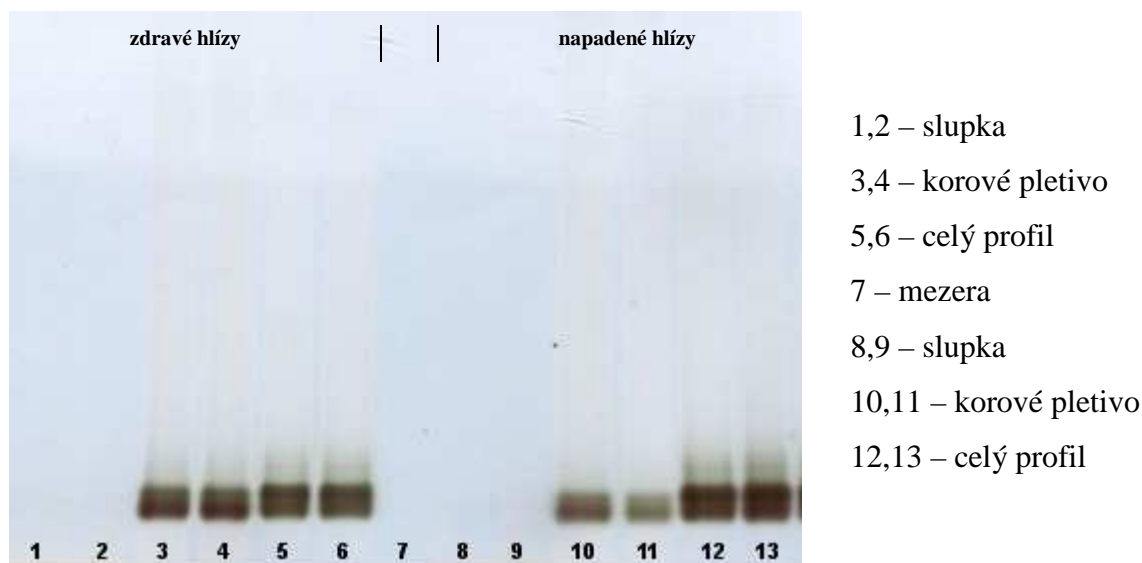
- 1,2 – slupka
- 3,4 – korové pletivo
- 5,6 – celý profil
- 7 – mezera
- 8,9 – slupka
- 10,11 – korové pletivo
- 12,13 – celý profil

Odrůda Vlasta

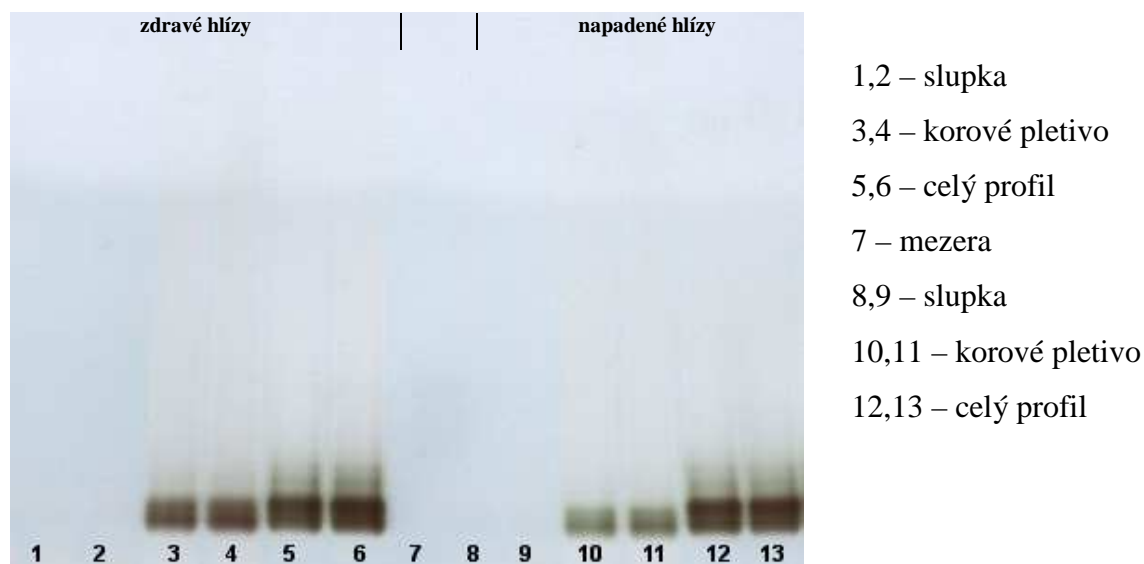
Ve slupkách nezralých hlíz odrůdy Vlasta (obr. 19 a 20) nebyl detekován žádný signál LAH aktivity. Na gelu jsou v oblasti vnitřních pletiv hlíz obou stupňů zralosti k vidění 2 pruhy s relativní mobilitou 0,87 a 0,9 u zdravých i napadených hlíz, přičemž rozdíly mezi hlízkami odlišného zdravotního stavu jsou patrné v intenzitě pruhů. U napadených hlíz je vidět různá intenzita pruhů mezi variantou celých profilů a korových vrstev, kdy pruhy celoprofilových vzorků jsou oproti korovým vrstvám výrazně silnější. Významnou intenzitu dané aktivity můžeme tedy zaznamenat i v dužnině bramborových hlíz. U zralých hlíz je tato odlišnost výraznější.

Během zrání došlo v pletivech také ke změně intenzity pruhů – konkrétně k jejímu snížení.

Obrázek č. 19: Odrůda Vlasta, nezralé hlízy – LAH aktivita na gelu (nativní PAGE):



Obrázek č. 20: Odrůda Vlasta, zralé hlízy – LAH aktivita na polyakrylamidovém gelu (nativní PAGE):



4.3.2. Peroxidázová aktivita

Na rozdíl od aktivity LAH bylo mezi odrůdami Valfi a Vlasta zaznamenáno zcela odlišné spektrum izoenzymů s peroxidázovou aktivitou. V hlízách odrůd Vlasta je možné vidět až 5 izoform tohoto enzymu, zatímco v hlízách odrůdy Valfi jsou detekovatelné maximálně 3 izoenzymy.

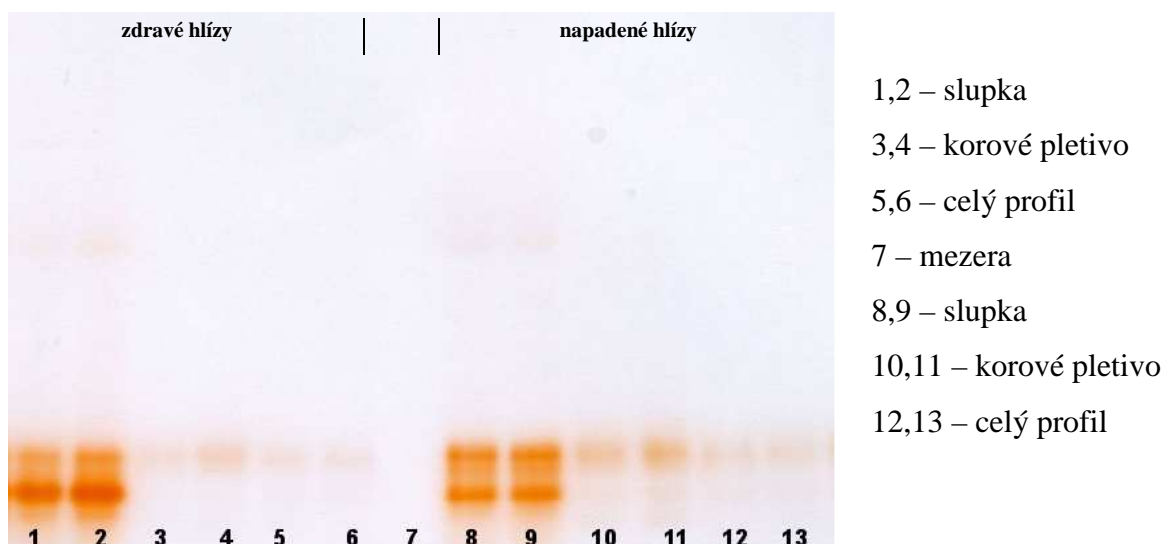
Odrůda Valfi

Jak je patrné z obrázků č. 21 a 22, intenzivnější pruhy peroxidázové aktivity byly u odrůdy Valfi detekovány ve slupkách. U nezralých hlíz zde byl detekován 1 pruh s R_f 0,45 a skupina dvou pruhů s R_f 0,78 a 0,84. V oblasti ostatních pletiv se nachází pouze slabý pruh s R_f 0,79. Mezi slupkami zdravých a napadených nezralých hlíz této odrůdy lze podle intenzity pruhů usuzovat na rozdíl v rozložení aktivity mezi jednotlivé izoenzymy.

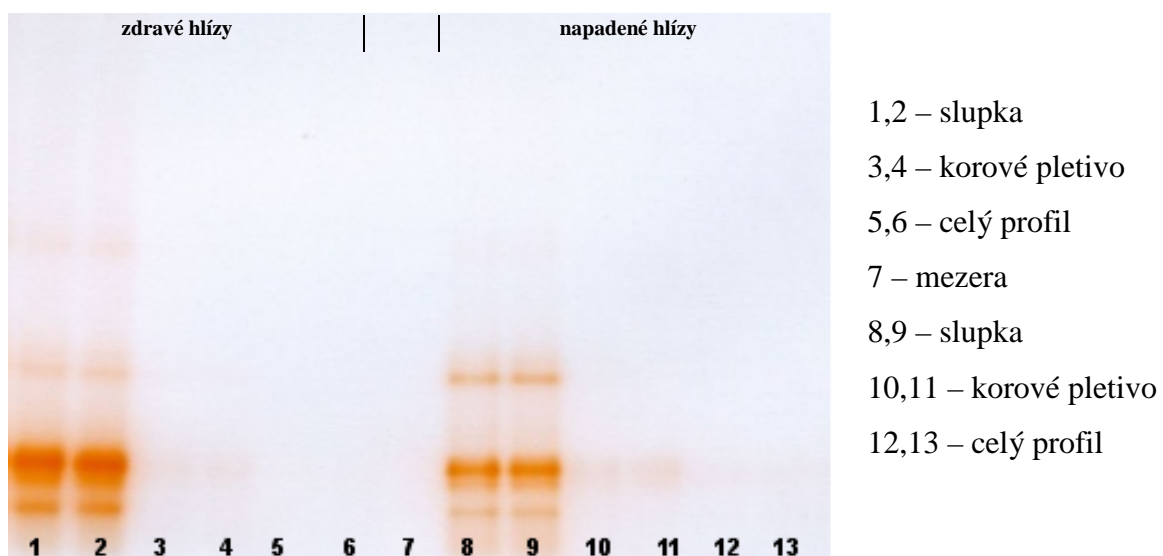
Přítomnost peroxidáz v korových pletivech hlíz odrůdy Valfi byla detekována i ve zralých hlízách. Peroxidázová aktivita v rámci celého profilu hlíz se během zrání

ztrácí. Ve slupkách se objevilo oproti nezralým hlízám i několik dalších peroxidázově aktivních izoenzymů, a to v oblasti Rf 0,64 a 0,81 (u napadených hlíz 0,82). U napadených hlíz došlo během zrání ke ztrátě pruhu s Rf 0,45.

Obrázek č. 21: Odrůda Valfi, nezralé hlízy – peroxidázová aktivita na polyakrylamidovém gelu (nativní PAGE):



Obrázek č. 22: Odrůda Valfi, zralé hlízy – peroxidázová aktivita na polyakrylamidovém gelu (nativní PAGE):



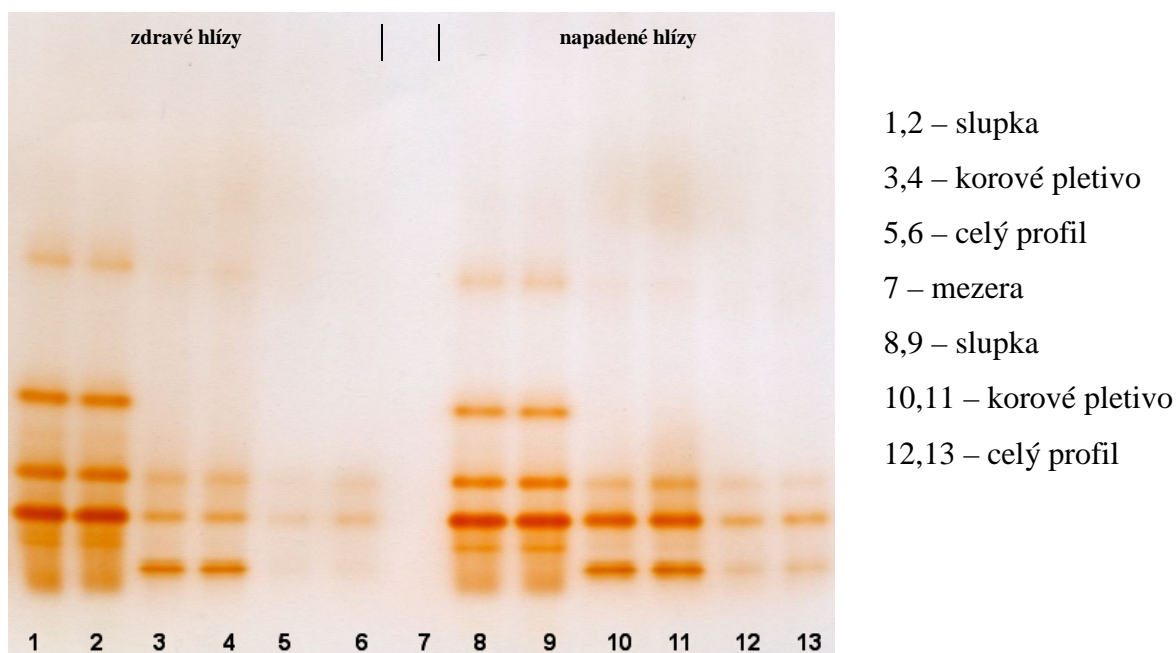
Odrůda Vlasta

U odrůdy Vlasta jsou značné rozdíly vidět mezi všemi variantami pletiv. Nejvíce peroxidáz je aktivních ve slupkách hlíz (obr. 23 a 24), ale dále se ve větší míře vyskytují i v ostatních pletivech. U této odrůdy by se spektrum pruhů dalo rozdělit do tří oblastí – první oblast relativní mobility 0,41, druhá oblast s Rf 0,64 a oblast třetí zahrnující pruhy s Rf 0,78-0,9.

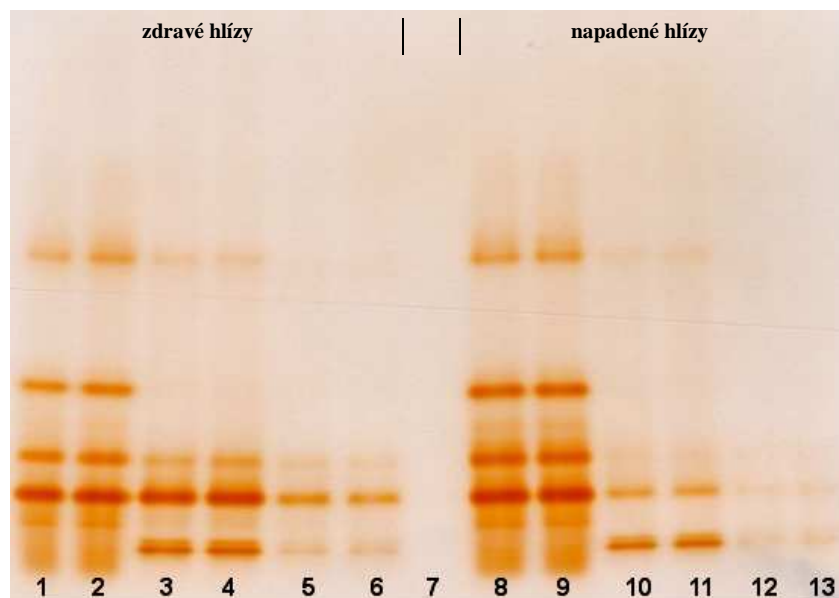
Ve slupkách nezralých hlíz jsou přítomné všechny tyto oblasti, zatímco ve vnitřních pletivech druhá oblast chybí úplně a náznak pruhů s Rf 0,41 by se mohl najít u korových pletiv. Rozdíl mezi zdravými a napadenými hlízami je v těchto pletivech patrný pouze v intenzitě pruhů. Ve slupkách bylo u zdravých i napadených hlíz detekováno 5 pruhů – oproti korovým pletivům přibyl protein s Rf 0,64.

Na obrázku č. 24 s profilem peroxidázově aktivních proteinů ve zralých hlízách odrůdy Vlasta je stejně jako u nezralých hlíz patrný rozdíl mezi zdravými a napadenými hlízami zejména v intenzitě pruhů. V celých profilech hlíz došlo navíc u napadených hlíz ke ztrátě jednoho peroxidázově aktivního proteinu s Rf 0,79.

Obrázek č. 23: Odrůda Vlasta, nezralé hlízy – peroxidázová aktivita na polyakrylamidovém gelu (nativní PAGE):



Obrázek č. 24: Odrůda Vlasta, zralé hlízy – peroxidázová aktivita na polyakrylamidovém gelu (nativní PAGE):

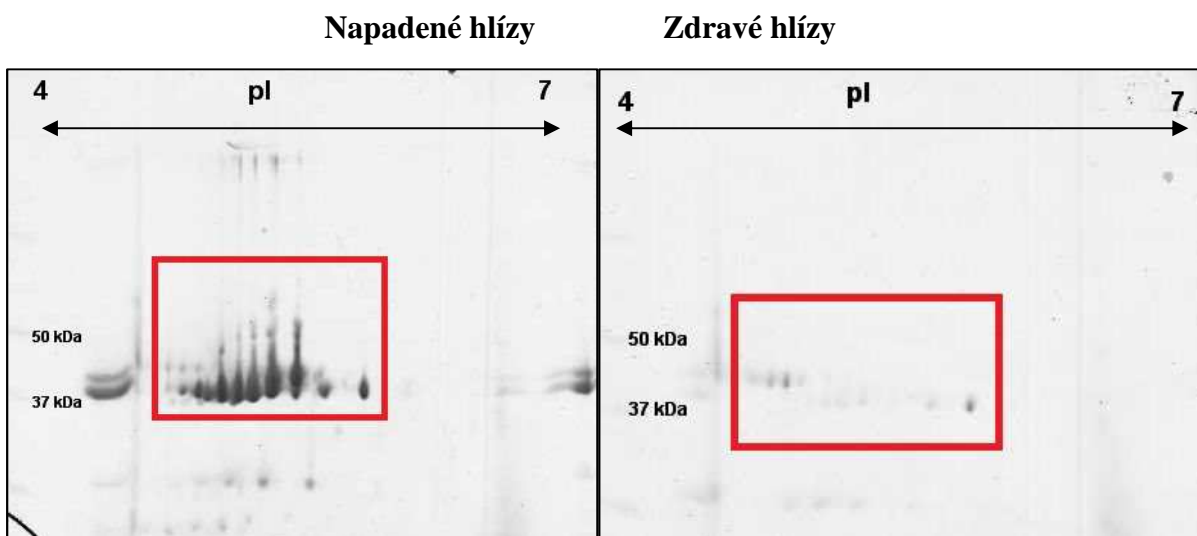


- 1,2 – slupka
- 3,4 – korové pletivo
- 5,6 – celý profil
- 7 – mezerá
- 8,9 – slupka
- 10,11 – korové pletivo
- 12,13 – celý profil

4.4. Hodnocení profilu proteinů pomocí 2D-PAGE

Na základě značných rozdílů v SDS-PAGE profilech zjištěných v oblasti patatinových proteinů byly slupky zralých hlíz odrůdy Valfi analyzovány pomocí 2D-PAGE. Pro tuto analýzu byly nejprve proteiny této oblasti chromatograficky purifikovány a po 2D-PAGE bylo v napadených hlízách v oblasti 37-50 kDa ve dvou úrovních molekulové hmotnosti zaznamenáno 11 proteinových spotů, což by mohlo naznačovat výskyt většího množství izoform lišících se hmotnostní úrovní a hodnotou izoelektrického bodu. U zdravých hlíz byly nalezeny 4 izoformy v první úrovni hmotnosti a 3 izoformy v druhé (nižší) úrovni.

Obrázek č. 25: Odrůda Valfi- zralé hlízy – analýza oblasti 37-50 kDa po 2D-PAGE



5. Diskuze

5.1. Obsah sušiny a stanovení proteinů v sušině hlíz

Obsah sušiny dosahoval u nezralých hlíz nejširšího rozpětí v korových pletivech, a to od 14,1 % (napadené hlízy odrůdy Vlasta) do 20,2 % (zdravé hlízy odrůdy Valfi). Ve zralých hlízách byla nejmenší hodnota zjištěna ve slupkách napadených hlíz odrůdy Valfi (17,6 %) a největší hodnota pak byla naměřena ve slupkách napadených hlíz odrůdy Vlasta (25,3 %). U odrůdy Vlasta došlo mezi jednotlivými odběry hlíz k většímu nárůstu obsahu sušiny než u odrůdy Valfi, který by mohl být způsoben, mimo jiné, kratší délkou vegetační doby. Odrůda Valfi je polopozdní až pozdní odrůda, což by mohl být, jak uvádí Vreugdenhil *et al.* (2007), důvod pro její vyšší obsah sušiny než je tomu u odrůdy Vlasta. Naměřené hodnoty také odpovídají zjištění, že menší hlízy (v našem případě hlízy odrůdy Vlasta) obsahují sušiny méně (Lisińska, Leszczyński, 2002).

Zastoupení proteinů v sušině hlíz se pohybovalo u nezralých hlíz od 2,3 % (slupka napadených hlíz odrůdy Valfi) do 5,6 % (celý profil napadených hlíz odrůdy Vlasta). Ve zralých hlízách to bylo 3,5 % (celý profil zdravých hlíz odrůdy Valfi) až 8,2 % (slupky napadených hlíz odrůdy Valfi). Z výsledků je patrné, že obsah proteinů mezi jednotlivými odrůdami je rozdílný. U zdravých zralých hlíz odrůdy Valfi byl zjištěn obsah proteinů v sušině celých profilů 3,5 % a u odrůdy Vlasta 4,4 %. Zvláště se rozdíl mezi odrůdami promítá mezi slupkami zralých hlíz obou odrůd, kde bylo ve slupkách nalezeno více proteinů u odrůdy Valfi. Ve slupkách zralých hlíz je také patrný rozdíl mezi zdravými a napadenými hlízami: napadené hlízy odrůdy Valfi obsahovaly ve slupkách více proteinů než zdravé, zatímco u odrůdy Vlasta došlo zřejmě vlivem napadení obecnou strupovitostí k poklesu množství proteinů. Obsah proteinů v hlízách bramboru závisí na mnoha faktorech, jako je odrůda, stupeň vývoje hlízy, doba skladování a ekologické podmínky (Bárta, Bártová, 2008). Také existuje vztah mezi hmotností hlíz a obsahem proteinů, jak jej uvádí ve své práci Bárta a Bártová (2007). Podle tohoto vztahu se usuzuje, že menší hlízy obsahují více proteinů. V rámci celých profilů hlíz s menší hmotností (odrůda Vlasta) se to potvrdilo u nezralých napadených hlíz a zralých zdravých hlíz.

5.2. Analýza spekter hlízových proteinů

5.2.1. SDS-PAGE

Metodou čipové elektroforézy se nepodařilo detekovat v pletivech slupky žádné proteiny a pro tento účel tedy neposkytovala uspokojivé výsledky. Analýza hlízových proteinů probíhala pomocí SDS-PAGE.

Barel a Gintzberg (2008) zjistili ve slupkách nezralých hlíz poměrně vysoké množství patatinu v porovnání se zralými hlízami. Toto zjištění odpovídá analýzám patatinové oblasti v případě odrůdy Vlasta, zatímco u odrůdy Valfi to potvrdit nelze. Patatin je zřejmě přítomný ve všech odrůdách brambor (Bárta, Čurn, 2004). Při SDS-PAGE separaci proteinů hlízy může být v patatinové oblasti nalezen rozdílný počet pruhů. Molekulová hmotnost patatinu se uvádí v rozmezí 40-43 kDa (Bárta, Čurn, 2004) a jeho zastoupení pak 40-45 % (Jiménez *et al.*, 2003; Rosahl *et al.*, 1986; Shewry, 2003). Zjištěné hodnoty zastoupení patatinu na celém proteinovém spektru se pohybovaly od 34,2 do 47,2 % u odrůdy Valfi a od 39,8 do 69,4 % v hlízách odrůdy Vlasta, což by ukazovalo na velký vliv odrůdy na zastoupení těchto proteinů. Podle Bárty a Bártové (2007) má na relativní abundanci patatinu odrůda vliv největší. Rozdíly v molekulových hmotnostech jednotlivých izoform (38-52 kDa) by mohly být způsobeny různým počtem glykosylačních míst, v kombinaci s mutací v primární sekvenci patatinu (Bárta, Bártová, 2008). Ve vnitřních pletivech hlíz odrůdy Valfi byly všechny 3 pruhy v této oblasti silné a podle intenzity pruhů by se dalo usuzovat, že napadené hlízy obsahovaly těchto proteinů více než zdravé. Také ve slupkách zralých hlíz odrůdy Valfi byly patatinové proteiny znatelnější v napadených hlízách. Větší kumulace proteinů této oblasti v napadených hlízách by mohla souviset s obrannou reakcí rostliny, protože patatin má kromě zásobní funkce i řadu enzymových aktivit, které hrají roli při napadení rostlin (Hanusová, Čurn, 2007; Shewry, 2003). Patatin s aktivitou fosfolipázy A2 se např. účastnil vyvolání rezistentní reakce vůči patogenu *Phytophthora infestans* (Bárta, Čurn, 2004). U odrůdy Vlasta byl nejsilnější pruh o nejmenší molekulové hmotnosti.

Mezi zdravými a napadenými hlízami byly rozdíly mezi proteinovými spektry zejména v intenzitě pruhů a jejich detekovatelnosti. V hlízách odrůdy Valfi bylo zachyceno více izoform vždy v hlízách napadených, zatímco u odrůdy Vlasta tomu je

spíše naopak. Počet proteinových izoform a jejich funkce by tedy mohly souviset s reakcí hlízy dané odrůdy na napadení obecnou strupovitostí.

Pro přesnější kvantifikaci a identifikaci proteinů spekter detekovaných pomocí SDS-PAGE by ale bylo potřeba detailnější proteomické analýzy, což ale přesahuje rozsah této diplomové práce.

5.2.2. 2D-PAGE

Pomocí 2D-PAGE bylo ve slupkách napadených zralých hlíz odrůdy Valfi nalezeno 11 proteinových spotů. Protože u hlíz zdravých jich bylo detekováno méně, dalo by se usuzovat na jejich funkci související s napadením rostliny obecnou strupovitostí. Identifikaci jednotlivých podjednotek by bylo třeba zjistit jinou metodou, což ale přesahuje rámec této diplomové práce.

5.3. Hodnocení spekter izoenzymů lipidacylhydroláz a peroxidáz na gelu po nativní PAGE

Bárta a Bártová (2007) tvrdí, že v LAH aktivitě byly zjištěny značné kvantitativní i kvalitativní rozdíly na odrůdové úrovni. Ačkoliv detekcí aktivity na gelu nelze přesně kvantifikovat aktivitu enzymů ve vzorku, různá intenzita pruhů podobný závěr naznačuje. Z tohoto důvodu také nelze přesně určit míru jejich exprese v napadených hlízách a ukázat na souvislost mezi napadením hlízy a tvorbou a funkcí těchto proteinů v hlízách. Aktivita LAH bývá v řadě prací připisována patatinu (např. Bárta, Čurn, 2004; Shewry, 2003). Identifikaci proteinů detekovaných na gelu touto metodou ale určit nelze.

Podle Barela a Gintzberga (2008) lze nejvíce peroxidáz zachytit ve slupkách, což vyplývá i ze zjištěných výsledků. Ve slupkách odrůdy Vlasta bylo zachyceno 5 izoform tohoto enzymu. Podle některých studií (Udomprasert, Attathom, 1991) existuje pozitivní korelace i mezi napadením rostliny patogenem a zvýšením peroxidázové aktivity. Tuto souvislost ale naznačují pouze výsledky u zralých hlíz

odrůdy Vlasta a bylo by potřeba je ověřit nějakou kvantifikační metodou. Odrůda Valfi je považována za méně odolnou obecné strupovitosti, což by mohlo souviset s menším výskytem peroxidázových izoform v pletivech.

Tyto poznatky by bylo dále vhodné rozšířit o ročníkové opakování a detailnější analýzy, které by vedly k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých izoenzymů a určení míry jejich exprese.

6. Závěr

Na základě provedených analýz lze odvodit tyto závěry:

- Podle výsledků obsahu sušiny v celých profilech (tedy bez slupky) obsahovala méně sušiny odrůda Vlasta. Napadené hlízy odrůdy Valfi obsahovaly sušiny méně než hlízy zdravé. Ačkoliv i v rámci pletiv docházelo k mírným odlišnostem, největší rozdíly v obsahu sušiny byly logicky zjištěny mezi hlízami v různém stupni vývoje. V hlízách odrůdy Vlasta došlo mezi jednotlivými odběry hlíz k většímu nárůstu obsahu sušiny než u odrůdy Valfi, patrně způsobenému kratší délkou vegetační doby.
- Po faktoru zralosti měla na zastoupení proteinů v sušině největší vliv odrůda. U odrůdy Valfi byly také velmi výrazné rozdíly mezi slupkou a vnitřními pletivy. Rozdíl v obsahu proteinů mezi hlízami odlišného zdravotního stavu byl nejvíce patrný ve slupkách zralých hlíz obou odrůd, kdy u odrůdy Valfi obsahovaly více proteinů hlízy napadené a u odrůdy Vlasta hlízy zdravé. Nezralé hlízy odrůdy Vlasta (zdravé i napadené) obsahovaly ve slupkách výrazně více proteinů než Valfi. U zralých hlíz tomu bylo naopak.
- Pomocí SDS-PAGE byla získána spektra proteinů o různých molekulových hmotnostech. Mezi profily proteinů v jednotlivých vrstvách hlíz byly u obou odrůd zcela zásadní kvalitativní i kvantitativní rozdíly, zejména mezi slupkou a vnitřními pletivy. Ve slupkách hlíz bylo proteinových pruhů nejméně. V patatinové oblasti byly nalezeny 3 izoformy proteinů ve vnitřních vrstvách hlíz. Ve slupkách se jednalo o 2 proteinové izoformy nalezené pouze ve zralých hlízách. Mezi zdravými a napadenými hlízami byly rozdíly zejména v intenzitě pruhů proteinového spektra. V hlízách odrůdy Valfi bylo zachyceno více izoform vždy v hlízách napadených, zatímco u odrůdy Vlasta tomu bylo spíše naopak. Molekulové hmotnosti proteinů v patatinové oblasti se pohybovaly od 38 do 52 kDa. Zastoupení těchto proteinů se pohybovalo od 34,2 % (korové pletivo zralých napadených hlíz odrůdy Valfi) do 69,4 % (celý profil nezralých zdravých hlíz odrůdy Vlasta).

- Pomocí nativní PAGE a následnou detekcí enzymových aktivit byly zjištěny největší rozdíly v intenzitě, počtu nebo rozmístění pruhů mezi odrůdami, dále mezi pletivem slupky a vnitřními pletivy. V rámci dalších parametrů (zdravotní stav a stupeň zralosti) byly rozdíly nejmenší, většinou spíše v intenzitě pruhů. Dále pak rozdíly souvisely se změnou počtu proteinových izoform. LAH aktivita proteinů byla zachycena ve vnitřních pletivech hlíz. Ve slupkách byla ve formě slabých pruhů nalezena pouze u odrůdy Valfi. Nejvyšší počet pruhů vykazujících peroxidázovou aktivitu bylo detekováno ve slupkách, ale vyskytují se i v ostatních pletivech. U odrůdy Vlasta jsou značné rozdíly vidět mezi všemi variantami pletiv.
- Díky rozdílům v profilech pruhů u slupek zralých hlíz odrůdy Valfi na SDS-PAGE gelu byla patatinová oblast analyzována detailněji pomocí dvourozměrné elektroforézy. Bylo tak nalezeno 11 proteinových spotů v hlízách napadených a 7 hůře detekovatelných spotů v hlízách zdravých.

7. Seznam použité literatury

Agrios, G. N. (2005): Plant pathology. *Elsevier*, ISBN 978-0-12-044565-3, 922 p.

Babcock, M. J., Eckwall, E. C., Schottel, J. L. (1993): Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *Journal of General Microbiology* **139**, 1579-1586.

Barel, G., Gintzberg, I. (2008): Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3347-3357.

Barkai-Golan, R. (2001): Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. *Elsevier*, ISBN 0-444-50584-9, 418 p.

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.

Bárta, J., Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, ISBN 978-80-7394-036-2, 116 p.

Bárta, J., Bártová, V., Diviš, J. (2010): Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chem. Listy* **104**, 33-40.

- Bárta, J., Bártová, V., Diviš, J.** (2009): Využití analýzy bílkovin hlíz na automatické čipové elektroforese Experion pro charakterizaci genotypů brambor: metodika pro praxi. ISBN 978-80-7394-159-8, 37 p.
- Bárta, J., Čurn, V.** (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.)-klasifikace, charakteristika, význam. *Chem. listy* **98**, 373-378.
- Bártová, V., et al.** (2009): Využití bílkovin hlíz analyzovaných na SDS-PAGE pro charakterizaci odrůd bramboru (*Solanum Tuberosum* L.): metodika pro praxi. ISBN 978-80-7394-158-1, 29 p.
- Bouarab, K., Brisson, N., Daayf, F.** (2009): Molecular Plant-Microbe Interactions. *CAB International*, ISBN 978-1-84593-574-0, 352 p.
- Cullen, D. W., Lees, A. K.** (2007): Detection of the nec1 virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* **102**, 1082-1094.
- Čermák, V.** (2010): Seznam doporučených odrůd bramboru. *ÚKZÚZ Brno*, ISBN 978-80-7401-025-5, 112 p.
- Diviš, J., Křišťufek, V.** (2003): Strupovitost brambor a význam odrůdy. *Collection of Scientific Papers* **20**, 5-9.
- Hanusová, L., Čurn, V.** (2007): Inhibitory proteas v hlíze bramboru. *Chem. listy* **101**, 536-541.

- Heřmanová, V., Bárta, J., Čurn, V.** (2006): Antifungální proteiny rostlin-klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chem. listy* **100**, 495-500.
- Hraška, M., Rakouský, S., Čurn, V.** (2006): Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chem. Listy* **100**, 501- 507.
- Issaq, H., M., Veenstra, T., D.** (2008): Two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques* **44**, 697-700.
- Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., et al.** (2003): Determination of the Phospholipase Activity of Patatin by a Continuous Spectrophotometric Assay. *Lipids* **38**, 677-682.
- Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., et al.** (2005): A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* **55**, 1025-1033.
- Křišťufek, V., Halbritter, A., Diviš, J., et al.** (2003): Obecná strupovitost brambor- detekce náchylnosti odrůd a opatření v pěstitelské praxi. *Ústav zemědělských a potravinářských informací*, ISBN 80-7271-138-5, 32 p.
- Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L.** (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. *Academia*, ISBN 80-200-0899-3, 347.

Lisińska, G., Leszczyński, W. (1989): Potato science and technology. *Elsevier*, ISBN 1-85166-307.

Loria, R., Bignell, D. R. D., Moll, S., et al. (2008): Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 3-10.

Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., et al. (1997): Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant diseases* **81**, 836-846.

McCord, J. M., Keele, B. B., Fridowich, I. (1971): An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 1024-1027.

Rosahl, S., Schmidt, R., Schell, J., et al. (1986): Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tubers. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 214-220.

Rybáček, V. (1988): Brambory. *Státní zemědělské nakladatelství*, 358 p.

Shewry, P. R. (2003): Tuber Storage Proteins. *Annals of Botany* **91**, 755-769

Spychalla, J. P., Desborough, S. L. (1990): Superoxide Dismutase, Catalase, and α -Tocopherol Content of Stored Potato Tubers. *Plant. Physiol.* **94**, 1214-1218.

Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y. (1988): A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* **34**, 497-500.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., et al. (2005): *Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno*, ISBN 978-80-210-3841-7, 188 p.

Udomprasert, N., Attathom, S. (1991): Peroxidase Isozyme Activity in Tomato Plants Infected by Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Nat. Sci.* **25**, 40-44.

Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, CH., et al. (2007): *Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Elsevier*, ISBN 978-0-444-51018-1, 823 p.

Žižka, J. (2009): *Situační a výhledová zpráva- Brambory. Ministerstvo zemědělství ČR*, ISBN 978-80-7084-894-4, 50 p.

Internetové zdroje:

ANONYMUS 1:

http://www.vubhb.cz/_t.asp?f=publikace/16strupovitost/default.htm [cit. 31.3.2011].

ANONYMUS 2:

http://www.vubhb.cz/_t.asp?f=publikace/16strupovitost/default.htm [cit. 31.3.2011]

ANONYMUS 3:

<http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/proteome/method/research01.htm> [cit. 23.4.2011]

ANONYMUS 4:

http://www.vubhb.cz/_t.asp?f=aktuality/2005/valfi.htm [cit. 10.12.2010].

8. Přílohy

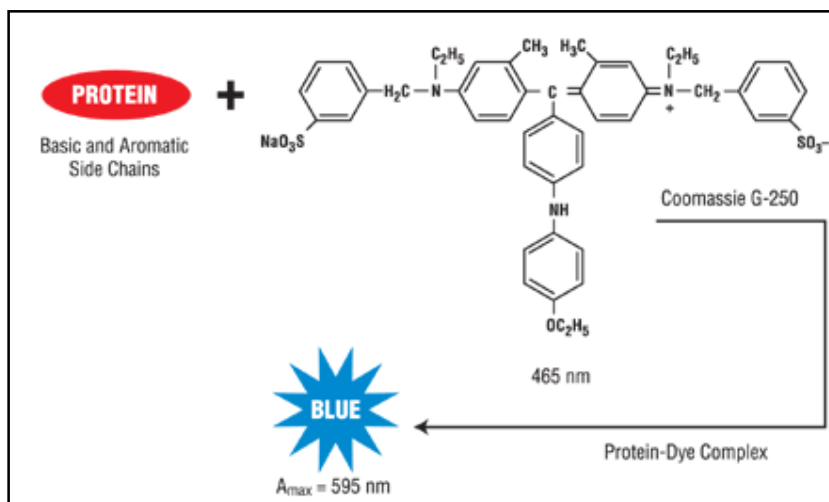
Příloha č. 1: Průběh počasí v oblasti Vyklantice za rok 2010

	průměrné měsíční teploty (°C)	srážky celkem za měsíc (mm)
leden	-4,85	72,00
únor	-1,93	23,90
březen	2,92	31,80
duben	8,00	62,80
květen	11,49	108,2
červen	16,10	71,50
červenec	19,34	114,50
srpen	16,42	114,50
září	10,71	89,90
říjen	5,58	6,90
listopad	4,37	57,60
prosinec	-4,13	65,30
		celkem 818,9

Příloha č. 2: Půdní podmínky na pozemcích ve Vyklantících

	pole bez strupovitosti	pole se strupovitostí
pH (CaCl ₂)	4,53	5,27
pH (KCl)	4,26	5,1
fosfor	85 mg/kg	97 mg/kg
draslík	167 mg/kg	284 mg/kg
hořčík	113 mg/kg	112 mg/kg
vápník	958 mg/kg	2061 mg/kg
KVK	122 mmolche/kg	175 mmolche/kg
sušina	98,30%	81,20%

Příloha č. 3: Reakční schéma analýzy proteinů podle Bradfordové



Zdroj: <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm> [cit. 23.2.2011]

Příloha č. 4: Složení jednotlivých pufrů pro nativní PAGE, SDS-PAGE a čipovou elektroforézu

R1	na 1 l
Tris	30,26 g
kyselina boritá	36,6 g
vanový pufr pro SDS-PAGE	na 1 l
glycin	144 g
Tris	30,3 g
SDS	10 g
Coomassie pufr	na 1 l
Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich)	1 g
metanol	500 ml
kyselina octová	100 ml
odbarvovací roztok	na 1 l
etanol	250 ml
kyselina octová	100 ml
fixační roztok	
etanol	450 ml
glycerol	30 ml
H ₂ O	500 ml
pufr A, pH=8,8	na 100 ml
Tris	36,3 g
pufr B, pH=6,8	na 100 ml
Tris	6 g
nanášecí pufr	
1M Tris-HCl (pH=6,8)	5 ml
SDS	2,3 g
glycerol	10 ml
BCP	5 mg

Příloha č. 5: Obsah sušiny v hlízách bramboru v %

zralé hlízy	Valfi			Vlasta		
	slupka	korové pletivo	celý profil	slupka	korové pletivo	celý profil
zdravé hlízy	20,2	23,6	21,2	21,7	20,4	20,5
napadené hlízy	17,6	22,1	20,6	25,3	20,8	20,6
nezralé hlízy	Valfi			Vlasta		
	slupka	korové pletivo	celý profil	slupka	korové pletivo	celý profil
zdravé hlízy	16,3	20,2	18,6	17,8	15,4	16,4
napadené hlízy	17,0	16,7	16,7	17,9	14,1	14,9

Příloha č. 6: Obsah proteinů v sušině hlíz v %

nezralé hlízy	Valfi			Vlasta		
	slupka	korové pletivo	celý profil	slupka	korové pletivo	celý profil
zdravé hlízy	2,4	4,4	4,8	5,1	4,7	4,8
napadené hlízy	2,3	4,6	4,2	5,4	5,3	5,6
zralé hlízy	Valfi			Vlasta		
	slupka	korové pletivo	celý profil	slupka	korové pletivo	celý profil
zdravé hlízy	6,4	3,7	3,6	5,9	4,8	4,4
napadené hlízy	8,2	3,8	4,4	4,4	4,5	4,2