

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Marek Glombik

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Fenotypová a proteomická charakterizace
ječmene (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise)
v podmínkách chladového stresu**

Bakalářská práce

Marek Glombik

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval zcela samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Marek Glombik

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá studiem chladového stresu na rostlinu ječmen setý (*Hordeum vulgare*), odrůdy Golden promise.

V teoretické části bakalářské práce jsou poznatky o ječmenu setém, působením stresů na rostliny se zaměřením na chladový stres, jeho signalizaci, důsledky a následné odpovědi rostlin na tento stres.

V praktické části jsou obsaženy výsledky experimentu vystavení rostlin ječmene setého chladovému stresu (2 °C) po dobu 23 dní a porovnání jejich fenotypu s fenotypem kontrolních rostlin. Stresované rostliny tvořily málo stonkových odnoží a dorůstaly malých dělek, tvořily malý počet adventivních a bočních kořenů o malých délkách. Navíc vykazovaly zakrslost a dosahovaly velmi malé hmotnosti. Dále tato část obsahuje výsledky proteomické analýzy, která zahrnovala porovnání optické hustoty proteinových skvrn z dvourozměrných proteinových map stresovaných a kontrolních rostlin. Bylo detekováno 31 proteinových skvrn v proteinových mapách stresovaných a kontrolních rostlin se statisticky významnou změnou optické hustoty na hladině významnosti 95 % ($p \leq 0,05$). Z dvourozměrných proteinových map stresovaných rostlin bylo u 14 skvrn pozorováno zvýšení a u 16 skvrn snížení optické hustoty oproti skvrnám dvourozměrných proteinových map kontrolních rostlin.

Summary

This bachelor thesis deals with study of cold stress on barley plants (*Hordeum vulgare*), cultivar Golden Promise.

Theoretical part of the thesis contain principal knowledge about barley, effects of stresses on plants with the focus on cold stress, its signalization, consequences and resulting response of plants to this type of stress.

Practical part contain results of the experiment in which barley plants were exposed to cold stress conditions (2 °C) for 23 days and then their phenotypes were compared with the phenotypes of control plants. Stressed plants were creating less stem branches and small number of adventitious and lateral roots with short lengths. Moreover stressed plants showed retarded growth of whole plant and very low weight. This part also contains results from proteomic analysis which included comparison of optical density of protein spots from two dimensional protein maps of stressed and control plants. In the protein maps of stressed and control plants, 31 protein spots were detected that had statistically significant change of optic density on significance level 95 % ($p \leq 0,05$). On these two dimensional protein maps of stressed plants 14 spots had increased and 16 spots had decreased level of optic density in contrast to two dimensional protein maps of control plants.

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Pavlu Vadovičovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady a věnovaný čas. Dále bych rád poděkoval Ing. Tomáši Takáčovi, Ph.D. za jeho ochotu a rady při vyhodnocování výsledků a v neposlední řadě bych velmi rád poděkoval prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za možnost práce na špičkovém vědeckém pracovišti a celému Oddělení buněčné biologie za příjemnou atmosféru při konání mé bakalářské práce.

Obsah

1. Cíle práce	9
2. Úvod	10
3. Současný stav řešené problematiky	11
3.1. Ječmen setý	11
3.2. Kultivace rostlin v živných roztocích	13
3.3. Vnímání stresových podmínek rostlinami	13
3.3.1. Chladový stres	14
3.3.2. Fenotypový projev chladového stresu	16
3.4. Proteomika	17
3.4.1. Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)	18
3.4.2. Rozdělení proteomiky	19
3.5. Proteom a abiotický stres u rostlin	21
3.5.1. Změna proteomu v chladovém stresu	21
3.6. Signalizace chladového stresu	24
3.6.1. MAPK signalizační dráhy	24
3.6.2. ICE-CBF/DREB signalizační dráhy	25
4. Materiál a metodika	27
4.1. Materiál	27
4.1.1. Použité chemikálie	27
4.1.2. Použité přístroje	28
4.1.3. Použité roztoky	29
4.1.4. Biologický materiál	31
4.2. Metodika	31
4.2.1. Povrchová sterilizace semen	31
4.2.2. Klíčení semen a kultivace rostlin při chladovém stresu a v kontrolních podmínkách	31
4.2.3. Odběr a příprava vzorků	32

4.2.4.	Extrakce proteinů	32
4.2.5.	Precipitace a čištění vyextrahovaných proteinů	33
4.2.6.	Měření koncentrace proteinů	33
4.2.7.	2-DE - Izoelektrická fokusace a úprava proteinů	34
4.2.8.	2-DE - Příprava polyakrylamidového gelu a dvourozměrné SDS-PAGE elektroforézy	34
4.2.9.	Vyhodnocení výsledků	35
5.	Výsledky	39
5.1.	Fenotypová charakterizace ječmene v chladovém stresu	39
5.2.	Proteomická analýza	43
6.	Diskuze	50
7.	Závěr	54
8.	Literatura.....	55
9.	Seznam použitých zkratek	64

1. Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma vliv chladového stresu u *Hordeum vulgare* a jednoděložných rostlin. Využití proteomických metod pro studium chladového stresu u rostlin.

2. Zavedení pěstování *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise a transgenní linie ječmene HvMPK3 v hydroponii v podmínkách chladového stresu.

3. Vyhodnocení fenotypových změn u *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise po působení chladového stresu. Získání proteinových extraktů z rostlinného materiálu.

4. Příprava a vyhodnocení gelů z dvoudimenzionální elektroforézy z proteinových vzorků z *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise po aplikaci chladového stresu.

2. Úvod

Chladový stres, který patří mezi abiotické stresy nepříznivě ovlivňuje růst a vývoj rostlin a významně omezuje jejich prostorovou distribuci a zemědělskou produktivitu (Chinnusamy *et al.*, 2007). Tento stres odpovídá podmínkám, ve kterých je teplota v rozmezí mezi 0 a 20 °C. Pokud jsou organismy vystaveny teplotě nižší než 0 °C, jsou vystaveny mrazovému stresu (Qureshi *et al.*, 2007). Vystavení rostlin chladu způsobuje závažné fyzické poškození rostlinných tkání a orgánů (Pearce, 2001) přičemž schopnost rostlin odolávat tomuto stresu je velice variabilní (Thomashow, 1998). Rostliny patří ke stabilním organismům, které nemohou uniknout změně podmínek prostředí, a proto s nimi musí neustále bojovat (Smékalová *et al.*, 2014). Odpovědi rostlin na abiotický stres jsou velmi komplexní (Cramer, 2010) a liší se v závislosti na pletivu nebo orgánu zasaženém stresem (Cramer *et al.*, 2011).

Proteiny jsou přímými účastníky mnoha obranných procesů v rostlinách, čímž výrazně ovlivňují fenotyp rostlin (Kosová *et al.*, 2014). Působení chladového stresu probíhá v několika fázích, jejichž výsledkem je následná reorientace metabolismu rostliny, která se odráží ve změně jejího proteomu (Kosová *et al.*, 2011). Studium proteomu v odpovědi rostliny na chladový stres pak zahrnuje sledování změny „abundance“ proteinů, sledování jejich post-translačních modifikací a změny v jejich lokalizaci uvnitř buňky (Šamaj *et Thelen*, 2007).

Přežití rostlin záleží na síti hustě propojených systémů pro rychlou percepci a reakci na různé podněty z prostředí (Tuteja *et Sopory*, 2008). Přenos těchto signálů je zajištěn pomocí komplexních signálních drah složených z proteinů, například mitogen-aktivovaných protein kinázových drah nebo v případě chladového stresu i ICE-CBF/DREB drah (Smékalová *et al.*, 2014; Miura *et Furumoto*, 2013).

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Ječmen setý

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je jednoletou, krytosemennou, jednoděložnou rostlinou z čeledi Lipnicovitých. Je to diploidní organismus s velikostí haploidního genomu 5,1 gigabází (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Tato plodina se vyskytuje ve dvou variantách, a to v zimní a v jarní. Hlavním rozdílem mezi těmito variantami je výtěžnost, která je u ozimého ječmene o 20-30 % vyšší oproti jeho druhé, jarní variantě (Špunar *et al.*, 2002). Dutý stonek se nazývá stéblo, zárodek obsahuje jednu dělohu, hlavní kořen v pozdější fázi růstu zaniká a jeho funkci přebírají postranní kořeny. Květenstvím ječmene je klas a plodem obilka. Ječmen je řazen mezi obilniny, což jsou jedny z nejdůležitějších plodin na světě, jejichž semena se, díky své bohaté nutriční hodnotě, již po tisíce let využívají v zemědělství pro lidskou výživu, jako zvířecí krmivo a také ve sladovnictví. I v nedávné době obilniny ještě stále tvořily asi dvě třetiny celosvětového lidského příjmu kalorií, ať už přímo, či nepřímo skrze maso a mléko zvířat živených obilninami (Dyson, 1999). Nejen ječná zrna, ale i zrna dalších obilnin obsahují rozpustnou vlákninu, která je důležitá pro lidské zdraví. Snižuje totiž riziko vážných kardiovaskulárních chorob, cukrovky typu II a rakoviny tlustého střeva (Collins *et al.*, 2010). Důležitosti obilnin přispívá také fakt, že zemědělství je ještě stále v mnoha méně vyspělých zemích hlavním zdrojem příjmů. Podle statistik serveru statista.com byla hodnota vyprodukovaného ječmene v letech 2014 a 2015 139,7 milionů metrických tun (Statista, 2015).

Z důvodu svého širokého využití a stálé se zvyšujícího počtu obyvatel na Zemi jsou ječmen a ostatní obilniny důležitými experimentálními organismy, které je nutno studovat a zlepšovat jejich fyziologické vlastnosti šlechtěním a genetickým modifikováním, za použití rostlinných biotechnologií. Toto potvrzuje také fakt, že v rámci mezinárodní spolupráce byl realizován projekt, jenž měl za úkol provést kompletní osekvenování genomu ječmene. Tento projekt byl dokončen a publikován v časopise Nature v roce 2012 (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

Ve srovnání s mnoha ostatními obilovinami je ječmen odolnější rostlinou, a také jako ostatní rostliny z tribu *Triticeae* se vyskytuje v zimní a jarní variantě. Pro zimní variantu, rostoucí v oblastech s teplotou pod bodem mrazu, je klíčové, aby byla co nejvíce tolerantní vůči chladu a mrazu (Hlaváčková *et al.*, 2013). Proto je důležité, abychom porozuměli, jak

chlادový stres působí na tuto rostlinu, aby pomocí různých experimentů mohlo dojít ke zvýšení výtěžnosti této plodiny i v oblastech s nízkou teplotou.

Již v průběhu 20. století se začaly šlechtit různé odrůdy ječmene, za účelem získání linií rostlin se zvýšeným výnosem a linií odolných vůči biotickým a abiotickým stresům. Jednou z mnoha odrůd je Golden Promise, která byla vytvořena ve Velké Británii v roce 1956 z odrůdy Maythorpe za pomoci gama záření. Pěstitelům přinesla unikátní kombinaci žádaných agronomických vlastností jako rychlý růst a vývoj, krátká a tuhá stébla, dobrou odolnost vůči ztrátě klasů a semen a dobrou kvalitu sladu. V roce 1967 byla tato odrůda zahrnuta do seznamu anglických obilnin a později se rozšířilo její pěstování také do Skotska. Mutace, díky které tato odrůda vznikla byla dokonce vložena do mnoha dalších úspěšných odrůd. Nevýhodou odrůdy Golden Promise bylo, že byla náchylná k infekci padlí ječmene (*Erisiphe graminis* sp. *hordei*), ale díky používání účinných chemických prostředků si udržela dominantní pozici na britském trhu (Forster, 2001).

3.2. Kultivace rostlin v živných roztocích

Metoda kultivace rostlin v živných roztocích se odborně nazývá hydroponie. Jde o velmi starý systém pěstování rostlin široce využívaný v běžném životě hlavně ve velmi suchých krajinách. Jeho využití ve vědě umožňuje pěstovat rostliny za kontrolovaných podmínek, díky čemuž lze efektivně provádět experimenty vyžadující co nejmenší kontakt s potenciálními patogeny či jinými jevy ovlivňující růst a vývoj rostlin. V hydroponických systémech jsou nejčastěji kořeny přímo ponořeny do živného roztoku, avšak existuje i tzv. aeroponie, při které je živný roztok na kořeny nastříkáván (Kratsch *et al.*, 2006). Jelikož živný roztok plně nahrazuje půdu v hydroponickém systému, musí obsahovat potřebné živiny k přežití rostliny. Dnešní živné roztoky se složením látek moc neliší od těch, se kterými experimentovali vědci v brzkých fázích testování hydroponie. Jedním z nejpoužívanějších je tzv. Hoaglandův roztok (Hoagland *et Arnon*, 1950).

3.3. Vnímání stresových podmínek rostlinami

Za stres se označuje vystavení organismu abnormálním podmínkám. Stresy, které působí na rostliny se rozdělují na biotické a abiotické. Biotický stres je takový, který je způsoben jinými žijícími organismy, například patogeny a jejich toxickými produkty. Abiotický stres je způsoben měnícími se podmínkami vnějšího prostředí a může být fyzikální nebo chemické povahy. Rozlišuje se primární abiotický stres, kde patří sucho, zvýšená či snížená teplota, salinita prostředí, přítomnost těžkých kovů a toxických látek v prostředí a sekundární abiotický stres, kam patří osmotický a oxidativní stres (Vítámvás *et al.*, 2007). Rostliny se s různými typy stresu vypořádávají pomocí mnoha složitých molekulárních mechanismů, ale ne vždy se dokáží přizpůsobit nebo plně ubránit. Tyto mechanismy jsou pro více typů stresu propojené (Matsuoka *et al.*, 2002), což je pro rostlinu nápomocné, vypořádává-li se s více stresy najednou.

Odpovědi rostlin na abiotický stres jsou velmi komplexní (Cramer, 2010) a liší se v závislosti na pletivu nebo orgánu zasaženém stresem (Cramer *et al.*, 2011). Také síla a délka působení stresu může mít vliv na složitost odpovědi (Tattersall *et al.*, 2007; Pinheiro *et Chavez*, 2011). Důležitými signálními molekulami ovlivňujícími odpověď rostlin na jejich okolní prostředí jsou ethylen, reaktivní částice kyslíku (ROS), reaktivní částice dusíku (RNS), a také rostlinné hormony, z nichž nejdůležitějšími je kyselina abscisová (ABA) (Goda *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2011).

3.3.1. Chladový stres

Chladový stres nepříznivě ovlivňuje růst a vývoj rostlin, silně omezuje jejich prostorovou distribuci a zemědělskou produktivitu, zabraňuje projevu genetického potenciálu, a to buď přímo inhibicí metabolických reakcí či nepřímo skrz chladem indukovaným osmotickým nebo oxidativním stresem (Chinnusamy *et al.*, 2007). Schopnost rostlin odolávat chladovému stresu je velmi variabilní. Tropické rostliny nejsou schopny odolat nejslabším mrazům. Naproti tomu byliny mírného pásu mohou přežívat mráz v rozsahu teplot od -5 do -30 °C a vytrvalé rostliny dokonce přežívají zimní období v tajgách při teplotách pod -30 °C (Thomashow, 1998). Vystavení rostlin chladu způsobuje snížení fluidity cytoplazmatických membrán, příjmu vody a živin, změnu konformace proteinů a nukleových kyselin (Chinnusamy *et al.*, 2007) a fyzické poškození rostlinných tkání a orgánů (Pearce, 2001). Chladový stres odpovídá podmínkám, ve kterých je teplota mezi 0 a 20 °C. Pokud jsou rostliny vystaveny teplotě nižší než 0 °C, jsou vystaveny mrazovému stresu. Následná dehydratace buněk způsobená mrazem má často za následek denaturaci proteinů či precipitaci různých molekul (Qureshi *et al.*, 2007). Na základě schopnosti odpovědět na chladový stres můžeme rostliny rozčlenit na odolné vůči chladu a citlivé vůči chladu (Ahamed *et al.*, 2012).

Působení chladového stresu na jednoděložné rostliny, a především na ječmen ještě není zcela podrobně prozkoumáno. Nicméně již před více než dvaceti lety byl proveden výzkum, kterým se zjišťovala existence chladem regulovaných genů u ječmene. Výsledkem byla izolace pěti různých cDNA klonů, u nichž bylo prokázáno, že reprezentují chladem regulované transkripty. U jednoho z nich bylo dokázáno, že kóduje produkt, vyskytující se pouze v listech jedinců vystavených chladovému stresu (Cattivelli *et Bartels*, 1990). Dnes je známa existence vícerých genů regulovaných chladem, které mohou být sekundárně spuštěny aplikací kyseliny abscisové, která je klíčovým rostlinným hormonem, jež se uplatňuje při odpovědi na jiný typ stresu, například na suchu. Geny z Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) zapojené v chladovém stresu jsou např. *COR* geny (chladem regulované), *LTI* geny (vyvolané nízkou teplotou), *KIN* geny (chladem vyvolatelné), *RD* geny (reagující na vysychání) a *ERD* geny (vyvolatelné brzkou dehydratací) (Thomashow, 1998). V jiných výzkumech bylo zjištěno, že při nízkých teplotách se u ječmene narušuje fotosyntetický aparát. Dochází k nadprodukci volných elektronů, které mohou poškozovat reakční centra fotosystému II (konkrétně D1 proteiny) a chladový stres může poté vést až k inhibici elektronového transportu (Busconi *et al.*, 2001).

Byly také prováděny experimenty založené na předpokladu, že nadexprese genů zajišťujících ochranu proti určitému stresu nebo adaptaci na něj by mohla zajistit okamžitou toleranci organismu k uvedenému stresu (Mrízová *et al.*, 2013). U ječmene byl nadexprimován transkripční faktor Osmyb4. Transgenní rostliny exprimující tento faktor měly zvýšenou toleranci vůči mrazu a také lepší klíčení v nízkých teplotách s malým efektem na růst rostliny (Soltész *et al.*, 2012). Podobně byla u Rýže seté (*Oryza sativa*) testována nadexprese genu *OsAOXI* pro enzym alternativní oxidázu, která je zapojena v elektronovém transportním řetězci mitochondrií. Výsledek experimentu ukázal, že růst transgenních rostlin při nízké teplotě 4 °C byl pouze zpomalen a nikoliv úplně inhibován, a také, že vyšší hladina tohoto enzymu zajistila nižší poškození buněčných membrán oxidativním stresem (Li *et al.*, 2013).

Proces, kterým se rostliny adaptují na chladový stres nazýváme aklimatizace. Přitom u rostlin dochází ke změnám genové exprese a metabolismu. Jev, díky kterému rostlina pociťuje nízké teploty je rigidifikace cytoplazmatické membrány (Chinnusamy *et al.*, 2010). To se děje při dosažení tzv. přechodné teploty, přičemž membrány složené z lipidů s nasycenými mastnými kyselinami dosahují rigidifikace při vyšší teplotě než membrány složené z lipidů s nenasycenými mastnými kyselinami. Rostliny citlivé vůči chladu mívají obvykle vyšší podíl nasycených mastných kyselin ve svých membránách, tudíž mají vyšší přechodnou teplotu. Naproti tomu rostliny odolné vůči chladu mají tedy vyšší podíl nenasycených mastných kyselin a nižší přechodnou teplotu (Yadav, 2009). Bylo prokázáno, že dimethylsulfoxid (DMSO), látka způsobující rigidifikaci membrány za normálních podmínek, vyvolá u Tolice vojtěšky (*Medicago sativa*) expresi COR genů zapojených do odpovědi na nízkou teplotu prostředí (Örvar *et al.*, 2000). Rigidifikace membrán dále způsobí otevření mechanosenzitivních kanálů pro vápenaté ionty, jejichž krátkodobý nárůst reguluje expresi COR genů (Ding *et al.*, 1993; Chinnusamy *et al.*, 2010). Zpracování signálu vyvolaného Ca²⁺ ionty se účastní mnoho látek, jako např. kalmodulin, Ca²⁺-dependentní protein kinázy, kalmodulin vázající transkripční aktivátory, proteiny podobné kalcineurinu B a další (Miura *et al.*, 2013). Co se týče účinnosti aklimatizace, Thomashow (1998) tvrdí, že pšenice rostoucí za normálních teplot by byla zabita při -5 °C, kdežto po úspěšné aklimatizaci by mohla vydržet v teplotách blízkých se -20 °C.

Zvláštní strategií rostlin je vernalizace, nebo také jarovizace. To je proces, kterým je vyvoláno kvetení po dlouhodobém vystavení rostliny nízkým teplotám, čímž se zajistí, aby rostliny začaly kvést až na jaře. Klíčové pro tuto strategii je, aby rostlina měla mechanismus,

který určí, že uběhla dostatečně dlouhá doba nízkých teplot, aby s následujícím oteplením mohlo začít kvetení (Amasino, 2004).

3.3.2. Fenotypový projev chladového stresu

Každá rostlina má své optimální rozmezí teplot, ve kterém se nejlépe vyvíjí a roste. Je-li vystavena mimo toto rozmezí, objeví se u ní viditelné příznaky poškození. U rostlin vystavených chladovému stresu se příznaky a zranění mohou objevit po 2 až 3 dnech od začátku vystavení stresu. Jedná se o zakrslost, snížení rozmachu listů, počtu odnoží, chloróza neboli žloutnutí listů, usychání a nekróza (Nahar *et al.*, 2009; Yadav, 2009). Problémy se snížením výnosu plodin jsou zapříčiněny působením chladového stresu na rostliny v reprodukční fázi vývoje (Satake, 1976; Nishiyama, 1984).

Modelový organismus jednoděložných rostlin je rýže (*Oryza L.*). Je také dobrým modelem když jde o chladový stres neboť je k nízkým teplotám více citlivá než ječmen či pšenice (Wen *et al.*, 2002). Experiment Ma *et al.* (2009) na rýži ukázal, že u standardních rostlin došlo k zastavení růstu po vystavení chladovému stresu 2 °C. Když je po 72 hodinách ve stresu vrátili do normálních růstových podmínek, žádná z rostlin již nebyla schopna obnovy růstu. Zajímavějším je starší experiment Sato *et al.* (2000), který prokázal, že vystavení semenáčků rýže nejdříve vysoké teplotě 42 °C, a poté chladu 5 °C zajistilo rostlinám rezistenci vůči chladu.

3.4. Proteomika

Proteomika je vědní obor, který studuje bílkoviny z hlediska jejich struktury, množství a funkce na úrovni buněk, tkání či celého organismu. Název proteomika je odvozen od termínu proteom, což je zkratka pro „protein complement of the genome“. Proteom tedy odpovídá souboru proteinů vzniklých expresí genomu (Kvasnicka, 2003). Proteiny představují hlavní funkční složku živých buněk a účastní se téměř všech pochodů v nich procházejících. Často fungují jako molekulární stroje organizované do multiproteinových komplexů (Alberts, 1998) lokalizovaných ve specializovaných buněčných kompartmentech. Jejich analýza nám tedy přináší unikátní pohled na to, jak fungují složité biologické systémy. Na rozdíl od genomu je proteom velmi nestálý. Množství a detekovatelný výskyt jednotlivých proteinů se mění v závislosti na stáří buňky, měnících se vlivech vnějšího prostředí na ni a při patologických stavech (Chmelik, 2005). Tudíž je potřeba mít velmi citlivé a efektivní analytické metody pro identifikaci, charakterizaci a kvantifikaci proteinů. V dnešní době nejpoužívanější metodou je hmotnostní spektrometrie, která umožňuje určit molekulovou hmotnost a chemickou strukturu zkoumaných peptidů.

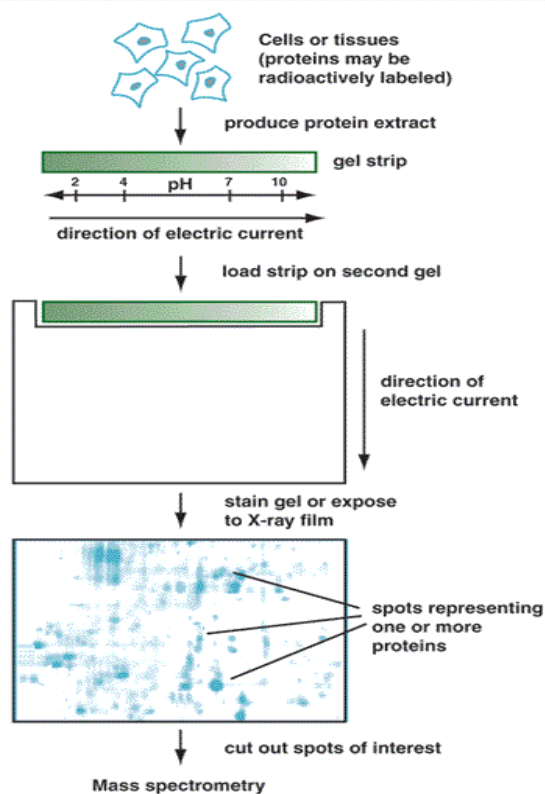
Existuje mnoho důvodů, které zabraňují dosažení cíle proteomiky, kterým je identifikace všech proteinů exprimovaných buňkou nebo tkání. To zahrnuje zjištění jejich struktury, sekvence, kvantita, úroveň modifikace, interakce s ostatními proteiny, aktivity a subbuněčné lokalizace (Patterson *et al.*, 2003). K velkému množství proteinů kódovaných genomem je nutno připočítat různé typy úprav, kterým většina proteinů podléhá. Takovýchto úprav může být i kolem tisíce (Agard *et al.*, 2012). Jako příklad můžeme uvést post-translační modifikace proteinů, kde patří fosforylace, glykosylace, acetylace a další (Kovářová, 2005). Jako další můžeme uvést vysoké rozdíly v koncentracích proteinů, které mohou způsobovat, že hojně zastoupené proteiny maskují ty, které se vyskytují v nižších koncentracích (Polaskova *et al.*, 2010).

V 70. letech u zrodu proteomiky hrálo roli představení moderní formy polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (dále SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Tato metoda umožňuje rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu na základě jejich molekulové hmotnosti. Nicméně samotná SDS-PAGE neposkytovala dostatečné rozlišení, kterého se později dosáhlo přidáním dalšího kroku, izoelektrické fokusace. Tímto se zrodila dvourozměrná elektroforéza (2D-elektroforéza, 2-DE). Vrcholem

jejího vývoje se však stala až o dekádu později konstrukce imobilizovaných pH gradientů a vývin gelových proužků, známých jako IPG stripy (Görg *et al.*, 1987; Rabilloud *et al.*, 2010).

3.4.1. Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)

Dvourozměrná elektroforéza je široce využívaná separační metoda pro analýzu proteinů extrahovaných z tkání a pletiv živých organismů. Sestává ze dvou odlišných separačních kroků. Prvním z nich je izoelektrická fokusace, při které se proteiny rozdělují na tenkém gelovém proužku či trubičce na základě jejich izoelektrického bodu (pI) v elektrickém poli a pH gradientu. Izoelektrický bod proteinu je hodnota pH, při které má protein celkový povrchový náboj neutrální. Jakmile protein tohoto bodu dosáhne, už se dál nepohybuje v elektrickém poli. Tato metoda je velice efektivní a má vysokou rozlišovací schopnost. Druhým krokem je poté SDS-PAGE, při které se proteiny rozdělené podle svých izoelektrických bodů separují na základě své molekulové hmotnosti. Principem tohoto kroku je, že molekuly detergentu SDS obalí proteiny, které tímto získají uniformní záporný náboj, takže se pohybují póry gelu v elektrickém poli pouze jedním směrem. Konečným výsledkem elektroforézy je tzv. dvourozměrná proteinová mapa zobrazující skvrny, které představují proteiny o určitém pI a molekulové hmotnosti (Rabilloud *et Lelong*, 2011). Ve viditelné formě skvrn jsou proteiny ovšem až po jejich obarvení. To se dá provádět třeba pomocí AgNO₃ nebo barviva Coomassie Brilliant Blue (Meyer *et Lamberts*, 1965; Heukeshoven *et Dernick*, 1985). Další analýza 2D proteinových map se provádí v softwaru na počítači. Velmi efektivní a často využívané se stalo spojení 2D elektroforézy s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje přesně identifikovat proteiny z gelu, pomocí určení sekvencí aminokyselin, ze kterých je protein tvořen.



Obr. 1: Princip dvourozměrné elektroforézy (Převzato z Hiller-Sturmhöfel *et al.*, 2008)

Nicméně ani dvourozměrná elektroforéza není dokonalou separační metodou. Jednou příčinou její nedokonalosti je fakt, že v místě jedné skvrny se může nacházet vícero odlišných proteinů (Gygi, *et al.*, 2000). Ty jsou sice shodné v pI a molekulové hmotnosti, ale liší se tvarem a velikostí, a tudíž i svou funkcí. Proto se používají také metody separace proteinů ve více než 2 rozměrech (Ventzki *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2013). I přes své nevýhody je 2D elektroforéza nejvhodnějším postupem pro některé účely experimentu. Podle Rabillouda (2002) je 2D elektroforéza zatím bezkonkurenční metodou pokud se zajímáme o kvantitativní změny v biologických procesech a kvantifikaci proteinových modifikací.

3.4.2. Rozdělení proteomiky

Na základě používaných metod či cílů rozlišujeme mnoho rozdílných přístupů v proteomice. Mezi často používané druhy proteomiky podle Chmelika (2005) patří:

Analytická proteomika – kombinuje separaci proteinů z biologických směsí, jejich charakterizaci pomocí hmotnostní spektrometrie a další zpracování zjištěných údajů pomocí bioinformatiky. Hlavní cíl je identifikace proteinů, stanovení jejich molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a určení post-translačních modifikací.

Strukturní proteomika – studuje strukturu proteinů pomocí krystalografie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetické rezonance a dalších technik. Cílem je pochopení strukturního chování proteinů a využití poznatků v proteinovém inženýrství při modifikacích proteinů za specifickými účely (léčiva, průmyslové enzymy atd).

Funkční proteomika – kromě funkce proteinů studuje také komplexní životní procesy, které je nutné pochopit pro studium vývoje organismu nebo pro studium mechanismu a léčby nemocí.

Diferenční (srovnávací) proteomika – cílem analýzy směsí proteinů je sledování změn jejich výskytu například při normálních a patologických stavech.

High-throughput proteomika – se zaměřuje na rychlé získání mnoha informací o proteinech pro zemědělské, zdravotnické a potravinářské účely.

High-coverage proteomika – získává údaje o sekvenci aminokyselin včetně post-translačních modifikací za účelem stanovení jejich pořadí v primární struktuře.

Bottom-up proteomika – běžný přístup k identifikaci proteinů, začínající separací směsi proteinů pomocí 2-DE, následně jejich enzymatickým štěpením na peptidy, které jsou identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Shotgun proteomika – také klasický postup, u kterého po enzymatickém štěpení proteinové směsi jsou vzniklé peptidy separovány, nejčastěji metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), a poté identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Top-down proteomika – postup, kdy je protein po izolaci ze směsi charakterizován pomocí MS/MS fragmentačních analýz v hmotnostním spektrometru. Tento přístup dává rychlé údaje o molekulové hmotnosti, sekvenci aminokyselin a post-translačních modifikacích u jednoduchých proteinových směsí.

3.5. Proteom a abiotický stres u rostlin

První studie o vlivu abiotického stresu na proteom rostlin byly publikovány v 80. letech 20. století. V té době ještě nebyla známa většina rostlinných proteinů, ale bylo možno pozorovat vliv stresu na syntézu proteinů *de novo* (Hurkman *et* Tanaka, 1987). Studium proteomu v odpovědi rostliny na abiotický stres zahrnuje analýzy vlivů vodního deficitu, zvýšené salinity, nízké a vysoké teploty, silného světla a přítomnosti toxických látek jako herbicidů či těžkých kovů na rostliny. Tyto jevy mohou ovlivňovat jak abundanci proteinů, tak jejich post-translační modifikace a změny v jejich lokalizaci uvnitř buňky. Mezi obecně pozorované jevy při abiotických stresech v rostlinách patří up-regulace „heat shock“ proteinů, které zastávají funkci molekulárních chaperonů, nebo degradace ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxidázy (RuBisCO) (Šamaj *et* Thelen, 2007). Důležitost proteinů ve stresových odpovědích je podtržena tím, že jsou přímými účastníky mnoha obranných procesů, čímž mají větší vliv na fenotyp než genové transkripty (Kosová *et al.*, 2014).

Rozlišuje se několik fází odpovědi na stres. Jsou to: alarmující fáze, aklimatizující fáze, udržovací fáze, vyčerpávající fáze a zotavující fáze. Alarmující fáze je charakterizována stresovým šokem na neaklimatizovanou rostlinu. U fáze aklimatizující dochází k nastavení nové homeostázy metabolismu probíhající ve stresových podmínkách. Tato fáze může trvat několik dní a po tu dobu se zvyšuje tolerance rostliny vůči stresu. V udržovací fázi se stabilizuje úroveň tolerance rostliny ke stresu a je udržována nově nastavená homeostáza. Vyčerpávající fáze nastává v případě, že rostlina není schopna udržet stresem nastavenou homeostázu z důvodu dlouhého trvání stresu. Tolerance rostliny se v této fázi snižuje. Po ukončení stresu nastává fáze zotavující. Obnovuje se původní homeostáza na úroveň nestresových podmínek. Změna metabolismu pro aklimatizaci rostliny vyžaduje přísun energie, která je získána pozastavením drah růstu a vývoje rostliny. To se pak samozřejmě odráží i na proteomu rostliny (Kosová *et al.*, 2011).

3.5.1. Změna proteomu v chladovém stresu

U obilovin se ukázalo, že přežití rostliny závisí na přežití pletiv v její bazální části. Tahle část rostliny propojuje kořeny a stonek a nachází se v ní meristematické pletivo, které zajišťuje obnovu růstu rostliny na jaře. Další důležitou částí rostliny jsou listy, které jakožto fotosyntetické orgány hrají důležitou roli v energeticky náročném procesu aklimatizace. Hlaváčková *et al.* (2013) testovali zimní odrůdu Ječmene setého, Luxor, na chladový šok (1 den, 3 °C), chladovou aklimatizaci (21 dní, 3 °C) a mrazivý šok po chladové aklimatizaci (1

den, -3 °C). Následně pomocí 2D elektroforézy a hmotnostní spektrometrie sledovali změnu výskytu proteinů v bazální části a v listech ječmene. Kvantifikovali kolem 700 proteinů v bazální části a kolem 600 proteinů v listech. Nižší počet kvantifikovaných proteinů v listech způsobovala přítomnost vysoce abundantních proteinů či jejich částí jako RuBisCO. Ty pak snižují možnost detekce málo abundantních proteinů. Proto bylo využito nefotosyntetických pletiv k analýze, čímž bylo možno detekovat právě ty proteiny, které nebyly detekovány v listech. Z 90 proteinů bazální části, u kterých byla změněná abundance víc než 2x, identifikovali 48 proteinů. Z 63 proteinů listů, u kterých byla změněná abundance víc než 2x, identifikovali 39 proteinů. Některé proteiny byly identifikovány vícekrát ve stejném pletivu. Lišily se ovšem v molekulové hmotnosti a/nebo v izoelektrickém bodu, tudíž šlo buď o různé izoformy stejného proteinu nebo odlišnosti v post-translačních modifikacích jednotlivých proteinů (Hlaváčková *et al.*, 2013).

Mezi proteiny, které vykazovaly velkou změnu ve výskytu po chladovém a mrazovém experimentu v listech patřila AAA ATPáza. Vyskytovala se v gelech ve dvou skvrnách, kde jednou vykazovala desetinásobné zvýšení abundance (spot 4106; 117 kDa, pI 5,37) a ve druhém případě devítinásobné snížení (spot 3329; 112 kDa, pI 5,6). Autoři uvádí, že to mohlo být způsobeno modifikací proteinu v reakci na stres způsobený mrazem. Proteiny AAA rodiny jsou důležité například pro degradaci špatně složených proteinů. Dalším proteinem, jehož výskyt byl devatenásobně vyšší po teplotním šoku je chloroplastový protein PsbO. Tento protein je součástí kyslíku vyvíjejícího komplexu ve fotosystému II a slouží zde ke stabilizaci manganu. U bazální části byl pozorován sedminásobně zvýšený výskyt heat shock proteinu 70, což je chaperon, který je důležitý pro skládání proteinů a zabraňuje jejich agregaci (Hlaváčková *et al.*, 2013).

Další proteiny, u kterých došlo ke snížení výskytu po stresu jsou elongační faktor Tu, který hraje klíčovou roli v elongační fázi proteosyntézy a glutamin syntetáza, která se účastní tvorby glutaminu. Naopak ke zvýšení výskytu došlo u peroxygenázy 1, která hraje roli v syntéze phytooxylipinů, důležitých látek pro obranné reakce rostlin (Hanano *et al.*, 2006).

Chen *et al.* (2012) zkoumali změnu proteomu v kořenech rýže po chladovém stresu. Separace proteinů byla provedena rovněž pomocí 2D elektroforézy a jejich následná identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Poté byly proteiny obarveny stříbrem a vyhodnoceny v počítačovém softwaru. Výsledkem kvantitativní analýzy gelu bylo 19 proteinových skvrn, u kterých došlo k výrazné změně intenzity. Z tohoto počtu ukazovalo

celkově 14 skvrn zvýšený výskyt a 5 skvrn snížený výskyt. Z identifikovaných proteinů se zvýšeným výskytem byly v článku uvedeny např. glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, kataláza, PPR (pentatricopeptide repeat) protein, fruktokináza, heat shock protein 70, fenylalanin amonium lyáza. Všechny identifikované proteiny se účastní různých procesů jako například metabolismu proteinů, aminokyselin či uhlovodíků, obranných odpovědí či redoxní homeostázy.

Jedním ze známých typů odpovědi mnoha rostlin, včetně ječmene, na chladový stres je akumulace proteinů dehydrinů. Tyto proteiny získaly svůj název díky své funkci zabraňovat dehydrataci buňky a tím ve stresových podmínkách udržovat její objem, aby nedošlo ke kolapsu buňky (Hanin *et al.*, 2011). Kromě tohoto, některé typy dehydrinů také chrání enzymy citlivé na nízké teploty, aby nedošlo k jejich deaktivaci, jiné zase pomáhají buňce zbavovat se hydroxylových radikálů. Za normálních podmínek se dehydriny vyskytují v různých oddílech buňky jako je cytosol, jádro, mitochondrie, vakuola a další. Byly pozorovány ve všech pletivech rostlin. Velmi se dehydriny akumulují v pozdní fázi embryogeneze (Rorat, 2006) a naopak snížená akumulace dehydrinů byla pozorována při vernalizaci (Kosová *et al.*, 2011). Všechny dehydriny obsahují alespoň jeden tzv. K-segment, což je konzervovaná část sekvence bohatá na aminokyselinu lysin. Kromě této mohou mít některé dehydriny i jiné konzervované sekvence, jako například Y-segment bohatý na tyrosin či S-segment bohatý na serin, které mohou podléhat fosforylaci, a která může hrát velkou roli v jejich lokalizaci v buňce (Kosová *et al.*, 2013). Hlavním akumulovaným dehydrinem u ječmene je protein DHN5 (Van Zee *et al.*, 1995). Kosová *et al.* (2013) ve svém experimentu podle očekávání potvrdili, že tento dehydrin se akumuluje u rostlin s vyšší tolerancí vůči mrazu již dříve, při vyšších teplotách, než u méně tolerantních druhů. Jejich data dokonce ukazují, že u vysoce tolerantních rostlin se tento dehydrin akumuloval i při 20 °C oproti ostatním rostlinným liniím. Na základě tohoto faktu by se tedy dehydriny daly využít jako spolehlivé proteinové markery tolerantních linií rostlin i bez toho, aby musely projít chladovým stresem. Dalším hlavním dehydrinem u ječmene je protein P-80. Při porovnání s DHN5 bylo zjištěno, že tyto proteiny mají podobnou molekulovou hmotnost, podobnou sekvenci a na základě experimentu v chladovém stresu také, že mají téměř stejnou ochrannou aktivitu. Snad jediným signifikantním rozdílem je, že produkce DHN5 může být spuštěna i na základě signálu kyselinou abscisovou, kdežto produkce P-80 ne (Bravo *et al.*, 2003).

3.6. Signalizace chladového stresu

Rostliny jsou přisedlé organismy a na rozdíl od živočichů se nemohou pohybovat, aby tak unikly nepříznivým podmínkám prostředí. Jejich přežití tedy záleží na síti hustě propojených systémů pro rychlou percepci a reakci na různé podněty z prostředí. Přenos signálů je zajištěn pomocí receptorových molekul nacházejících se na cytoplazmatické membráně a endoplazmatickém retikulu. Tyto receptory jsou saturovány specifickou chemickou látkou tzv. ligandem, jehož navázání způsobí změnu konformace receptoru a následným spuštěním dráhy chemických reakcí vedoucích k odpovědi na podnět. U rostlin jsou nejlépe popsány receptory spřažené s G-proteinem a transmembránové enzymatické receptory (Tuteja *et Sopory*, 2008). Známými a intenzivně zkoumanými signálními dráhami jsou například kaskádové dráhy mitogen-aktivovaných protein kináz.

3.6.1. MAPK signalizační dráhy

Signální dráhy mitogen-aktivovaných protein kináz (dále jen MAP kinázy) jsou sofistikované multienzymatické komplexy, které zajišťují u eukaryot přenos informací z receptorů na adekvátní buněčné odpovědi (Smékalová *et al.*, 2014). Analýzou rostlinných genomů bylo objeveno velké množství genů kódujících komponenty MAP kinázových signálních drah, což naznačilo, že tyto kaskády se hojně uplatňují v procesu přenosu signálů (Nakagami *et al.*, 2005). Dnes víme, že tyto dráhy regulují velkou řadu procesů jako buněčný růst, buněčnou diferenciaci, buněčný cyklus, smrt buněk a jejich odpovědi na stresové podmínky.

MAP kinázy jsou enzymy, což je typ proteinů, které zprostředkovávají průběh chemických reakcí v buňkách tím, že snižují aktivační energii, kterou je třeba dodat k tomu, aby reakce proběhla, ale zároveň nemění rovnováhu reakce. Jako kinázy se pak označují enzymy, které přenášejí fosfátovou skupinu na substrátový protein, čímž mohou pozměnit jeho aktivitu. Pro MAP kinázy je typické, že v základním stavu jsou neaktivní, defosforylované a právě jejich fosforylací u nich dojde k aktivaci. Defosforylací a tím deaktivaci MAP kináz zajišťují enzymy zvané fosfatázy (Rodriguez *et al.*, 2010). Fosforylací jako buněčný regulační mechanismus můžeme kromě MAP kináz pozorovat i u dalších signálních molekul, které hrají roli při odpovědích na stres. Jsou to například Ca^{2+} -dependentní protein kinázy či SNF-1 příbuzné protein kinázy (SnRK2) (Kosová *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

MAP kinázové kaskády jsou složeny z minimálně tří kinázových modulů. Tyto moduly tvoří reverzibilně fosforylovatelné enzymy, které zprostředkovávají další fosforylaci jiných enzymů, transkripčních faktorů či jiných proteinů, jejichž pozměněná aktivita poté vede k široké škále odpovědí na různé signály, jako například změnám v genové expresi. První model tvoří MAP kinázy kinázy kinázy, také zvané MAP3K, MAPKKK či MEKK. Tyto kinázy jsou aktivované stimulovanými receptory, které se nacházejí na plazmatické membráně. Druhým modelem aktivovaným následnou fosforylací jsou MAP kinázy kinázy, zvané MAP2K, MAPKK, MKK či MEK, a ty poté zprostředkují aktivaci posledních MAP kináz, MAPK (Rodriguez *et al.*, 2010).

MAP3K patří mezi serin/threonin kinázy, což znamená, že fosforylují MAP2 kinázy na serinových nebo threoninových zbytcích proteinů v konzervovaném S/T-X₃₋₅-S/T motivu. MAP2 kinázy fosforylují MAP kinázy na threoninových a tyrosinových zbytcích proteinů v T-X-Y motivu. MAP kinázy jsou promiskuitní serin/threonin kinázy, které fosforylují různé substráty (Nakagami *et al.*, 2005).

Bylo zjištěno, že v signalizaci chladového stresu u modelového rostlinného organismu, Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), hrají roli MPK4 a MPK6. Ty jsou aktivovány MKK2 nebo MKK1, které jsou zase aktivovány MEKK1. Aktivita MPK4 dosáhla nejvyššího bodu 60 minut po snížení teploty a aktivita MPK6 dosáhla nejvyššího bodu již po 10 minutách od vystavení nízké teplotě (Smékalová *et al.*, 2014). Homologem MPK4 z *Arabidopsis* je u ječmene HvMPK4. O této MAP kináze již bylo zjištěno, že se uplatňuje v signalizaci jak biotického tak abiotického stresu (Abass *et Morris*, 2013).

3.6.2. ICE-CBF/DREB signalizační dráhy

Další alternativní signální dráhou pro chladový stres je například ICE-CBF/DREB dráha. ICE (induktory exprese CBF) jsou transkripční faktory, které se podílí na kontrole převodu signálů regulací genů pro CBF/DREB proteiny (proteiny vázající se na dehydrataci respondující elementy – sekvence v DNA). U *Arabidopsis* jsou známy 3 CBF/DREB proteiny, které jsou zapojeny do regulace genové exprese *COR* genů (Gilmour *et al.*, 2004; Miura *et Furumoto*, 2013). Konstitutivně nadexprimované geny pro CBF/DREB proteiny u transgenního *Arabidopsis* prokázaly, že vyvolávají expresi *COR* genů bez chladového podnětu. Navíc se ukázalo, že neaklimatizované rostliny s nadexpresí genů pro CBF/DREB proteiny získaly větší toleranci vůči chladu než aklimatizované rostliny (Thomashow, 2001). Za standardních chladových stresových podmínek dochází k expresi *CBF* genů do 15 minut

a do 2 hodin od podnětu lze pozorovat akumulaci transkriptů *COR* genů (Gilmour *et al.*, 1998; Jaglo *et al.*, 2001). U ječmene byly zjištěny genové homology *HvCBF1*, *HvCBF2*, *HvCBF3* a *HvCBF4*, které se účastní regulace *COR* genů (Choi *et al.*, 2002; Xue, 2002; Xue, 2003; Oh *et al.*, 2007). Za hlavní transkripční faktor je považován ICE1, který reguluje asi 40 % všech *COR* genů a 46 % chladem regulovaných genů pro transkripční faktory. Mezi *COR* geny patří kupříkladu geny, kódující proteiny dehydriny (Lee *et al.*, 2005; Miura *et Furumoto*, 2013), gen *cor14b*, který kóduje protein neznámé funkce nacházející se ve stromě chloroplastů (Crosatti *et al.*, 1995) či gen *blt4*, který kóduje proteiny uplatňující se při transportu lipidů (Baldi *et al.*, 1999). Experimenty prokázaly, že *HvCBF2* je pouze ze 45 % homologní s *HvCBF1* a liší se ve svých DNA vazebných motivech. *HvCBF2* se pravděpodobně uplatňuje při odpovědi na chladový stres v brzké fázi, kdežto potenciální rolí *HvCBF1* je udržení a posílení exprese chladem indukovaných genů po vystavení stresu (Xue, 2003). Studium molekulárních mechanismů chladové aklimatizace a tolerance rostlin proti chladu či mrazu je velmi důležité, neboť může vést k vývinu nových strategií pro zlepšení tolerance rostlin a následně ke zvýšení produktivity rostlin (Thomashow, 1998).

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

4.1.1. Použité chemikálie

- 0,4% 2-merkapt ethanol C_2H_6SO (Sigma-Aldrich)
- 10% chlornan sodný $NaClO$ (Sigma-Aldrich)
- 40% Akrylamid (Bio-Rad)
- Aceton C_3H_6O (Sigma-Aldrich)
- Amfolyty (Sigma-Aldrich)
- Amid kyseliny jodoctové IAA (Sigma-Aldrich)
- Barvivo Coomasie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
- Činidlo Bradfordové (Sigma-Aldrich)
- Dihydrát molybdenanu disodného $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ (Sigma-Aldrich)
- Dihydrogen fosforečnan draselný KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Dithiothreitol DTT (Sigma-Aldrich)
- Dodecylsulfát sodný SDS (Sigma-Aldrich)
- Dusičnan amonný NH_4NO_3 (Sigma-Aldrich)
- Dusičnan draselný KNO_3 (Sigma-Aldrich)
- Ethanol C_2H_5OH (Penta)
- Glycerol $C_3H_8O_3$ (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu hořečnatého $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu zinečnatého $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid draselný KOH (Sigma-Aldrich)
- CHAPS detergent (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný KCl (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol C_3H_7OH (Sigma-Aldrich)
- Kyselina trihydrogenboritá H_3BO_3 (Sigma-Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková HCl (Sigma-Aldrich)
- Methanol CH_3OH (Sigma-Aldrich)
- Močovina CH_4N_2O (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin TEMED (Sigma-Aldrich)

- Octan amonný $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Sigma-Aldrich)
- Pentahydrát síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Duchefa Biochemie)
- Peroxodisíran amonný APS (Sigma-Aldrich)
- Precision Plus Protein standards (Bio-Rad)
- Sacharóza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (Sigma-Aldrich)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- Tetrahydrát chloridu manganatého $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- Thiomočovina $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ (Sigma-Aldrich)
- Tris-pufrovaný fenol pH 8,8 (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Železná sůl EDTA Fe-EDTA (Sigma-Aldrich)

4.1.2. Použité přístroje

- Analytické váhy XA110/2X (Radwag, Polsko)
- Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific, Nizozemsko)
- Digestoř (Merci, Česká republika)
- Elektromagnetická míchačka MSH-420 (Boeco, Německo)
- Fokusátor Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, USA)
- Hlubokomrazicí box MDF-U500VX-PE (Panasonic, Japonsko)
- Klimakomora AR-41L2 (Percival, USA)
- Kultivační místnost (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- Image Scanner III (Epson, Japonsko)
- Laboratorní předvážky S1502 (BEL, Itálie)
- Laminární box Faster (Schoeller instruments, Česká republika)
- Lednice Space plus (Electrolux, Švédsko)
- Mražák Liebherr (Schoeller instruments, Česká republika)
- Spektrofotometr SmartSpec Plus (Bio-Rad, USA)
- Termoblok (Bioer, Čína)
- Vortex Genie (Scientific industries, USA)
- Výkyvná třpačka MR-12 (Biosan, Lotyšsko)
- Zdroj napětí Electrophoresis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare, Velká Británie)

4.1.3. Použité roztoky

Roztok dusičnanů pro Hoaglandův živný roztok [1 mol/dm³]

101,1 g KNO₃

236,1 g Ca(NO₃)₂ x 4H₂O

80 g NH₄NO₃

Doplnit dH₂O na objem 1 l

Roztok MgSO₄ pro Hoaglandův živný roztok [1 mol/dm³]

246,5 g MgSO₄ x 7H₂O

Doplnit dH₂O na objem 1 l

Roztok Fe-EDTA pro Hoaglandův živný roztok [1 mol/dm³]

7,5 g Fe-EDTA

Doplnit dH₂O na objem 0,5 l

Roztok mikronutrientů pro Hoaglandův živný roztok

2,86 g H₃BO₃

1,8 g MnCl₂ x 4H₂O

0,2 g ZnSO₄ x 7 H₂O

0,08 g CuSO₄ x 5 H₂O

0,025 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O

Doplnit dH₂O na objem 1 l

Roztok KH₂PO₄ pro Hoaglandův živný roztok [1 mol/dm³]

136 g KH₂PO₄

Doplnit dH₂O na objem 1 l

Hoaglandův živný roztok (4 l)

3,758 l dH₂O

20 ml roztoku dusičnanů

8 ml roztoku MgSO₄

6 ml roztoku Fe-EDTA

4 ml roztoku mikronutrientů

4 ml roztoku KH₂PO₄

Extrakční pufr (20 ml)

6,156 g sacharózy rozpustit v 10 ml dH₂O

2 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8

0,058 g EDTA

0,149 g KCl

80 µl 2-merkaptoethanolu

Doplnit dH₂O na objem 20 ml

Roztok octanu amonného ve 100% methanolu [0,1 mol/dm³] (0,5 l)

3,85 g CH₃COONH₄ rozpustit v 500 ml 100% methanolu

Rehydratační pufr (20 ml)

9,609 g močoviny rozpustit v 10 ml dH₂O

3,044 g thiomčoviny

0,4 g CHAPS

0,4 ml Tritonu X-100

Před použitím přidat DTT (0,0077 g/1 ml)

Ekvilibrační roztok 1 (20 ml)

7,207 g močoviny rozpustit v 7 ml dH₂O

0,666 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8

0,4 g SDS

6 ml glycerolu

0,2 g DTT

0,02 ml bromfenolové modři

Ekvilibrační roztok 2 (20 ml)

7,207 g močoviny rozpustit v 7 ml dH₂O

0,666 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8

0,4 g SDS

6 ml glycerolu

0,5 g IAA

0,02 ml bromfenolové modři

„Running“ pufr pro SDS-PAGE 10x

30,35 g Tris

144,13 g glycinu

10 g SDS

1 l dH₂O

Před použitím zředit na koncentraci 1x.

4.1.4. Biologický materiál

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) divoký typ, ekotyp Golden Promise.

Celý experiment byl prováděn ve třech opakováních.

4.2. Metodika

4.2.1. Povrchová sterilizace semen

- 1) Semena divokého typu ječmene byly připraveny v 50ml plastových kónických zkumavkách se šroubovacím víčkem.
- 2) V laminárním boxu byl k semenům přidán 70% roztok ethanolu a nechal se působit za občasného protřepávání 30 sekund.
- 3) Celý objem ethanolu byl odebrán a semena byla 3x propláchnuta sterilní destilovanou vodou.
- 4) Celý objem destilované vody byl odebrán a k semenům byl přidán 5% roztok chlornanu sodného a nechal se působit za občasného protřepávání 4 minuty.
- 5) Celý objem roztoku chlornanu sodného byl odebrán a semena byla 4x propláchnuta sterilní destilovanou vodou.

4.2.2. Klíčení semen a kultivace rostlin při chladovém stresu a v kontrolních podmínkách

- 6) Sterilizovaná semena byla rozložena na vlhký filtrační papír, který se stočil do ruličky a postavil do kádinky s malým objemem destilované vody, semeny nahoru.
- 7) Kádinka byla poté umístěna do lednice při 4 °C.
- 8) Po třech dnech byla kádinka se semeny přemístěna do kultivační místnosti H220B (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) s konstantní teplotou 22 °C, relativní vlhkostí 70 % a fotoperiodou 16/8 h (kultivace s osvětlením/kultivace ve tmě).
- 9) Po dalších třech dnech byly vyklíčené rostliny přesunuty do kultivačních nádob s živným roztokem.

- 10) Do kultivačních nádob bylo vloženo provzdušňovací zařízení.
- 11) Jedenáctý den byly rostliny vyfotografovány.
- 12) Chladový stres byl proveden v klimakomoře Percival AR-41L2 (USA) při 2 °C s relativní vlhkostí 70 % a fotoperiodou 16/8 h (kultivace s osvětlením/kultivace ve tmě). Polovina rostlin byla přenesena do klimakomory pro testování chladového stresu a druhá polovina byla ponechána jako kontrolní vzorky v původní kultivační místnosti H220B (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) při výše uvedených podmínkách kultivace. Tyto podmínky byly udržovány po celou dobu experimentu až do jeho ukončení.
- 13) Živný roztok byl vyměňován 2x týdně do doby ukončení experimentu.

4.2.3. Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorků testovaných i kontrolních rostlin byl proveden 23. den od přenosu rostlin do klimakomory Percival AR-41L2 (USA).

- 14) Rostliny byly vyfotografovány, zváženy, a poté jim byly odebrány kořeny pro další práci.
- 15) Kořeny byly zhomogenizovány v tekutém dusíku a homogenát byl vložen do 50ml kónické zkumavky.

4.2.4. Extrakce proteinů

Analýza proteinů dvourozměrnou elektroforézou byla provedena podle protokolu od Hurkmana a Tanaky (1986).

- 16) Do 2ml plastové mikrozkušavky bylo odváženo asi 0,3 g homogenátu.
- 17) K homogenátu se v digestoři přidalo 0,7 ml extrakčního pufru vychlazeného na 4 °C a homogenát se inkuboval 15 minut na ledě.
- 18) Následně se přidalo 0,7 ml Tris-pufrovaného fenolu o pH 8,8 a vzorek se dobře promíchal na míchačce a inkuboval na ledě za občasného promíchávání po dobu 30 minut.
- 19) Vzorek se zcentrifugoval po dobu 10 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C.
- 20) Do nové mikrozkušavky se odebrala horní fenolová fáze a k spodní fázi se přidalo 0,5 ml Tris-pufrovaného fenolu o pH 8,8.
- 21) Mikrozkušavka s homogenátem se opět promíchala na míchačce a zcentrifugovala po dobu 10 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C.

- 22) Znovu byla odebrána horní fenolová fáze a přidána k předchozí odebrané fenolové fázi.
- 23) Výsledný objem fenolových fází byl rozdělen po 300 μ l do nových mikrozkuvek.

4.2.5. Precipitace a čištění vyextrahovaných proteinů

- 24) Ke vzorku se přidal roztok octanu amonného ve 100% methanolu vychlazený na -20 °C v pětinašobku původního objemu roztoku, mikrozkuvky se promíchaly na míchačce a byly uchovány přes noc při teplotě -20 °C, kdy probíhala precipitace proteinů.
- 25) Další den se vzorek promíchal na míchačce, a zcentrifugoval po dobu 15 minut při 15 000 g a teplotě 4 °C.
- 26) Odebral se supernatant a usazenina (proteinový pelet) se rozsuspendovala v roztoku octanu amonného ve 100% methanolu vychlazeného na -20 °C a inkubovala po dobu 15 minut při -20 °C.
- 27) Krok 24 a 25 se zopakoval 2x s 80% acetonem vychlazeným na -20 °C, poté 2x se 70% ethanolem vychlazeným na -20 °C, přičemž první inkubace v obou roztocích trvala 1 hodinu a druhá inkubace 15 minut. Nakonec se tyto kroky ještě zopakovaly 1x s 80% acetonem vychlazeným na -20 °C.
- 28) Po poslední centrifugaci se proteinový pelet nechal vysušit po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a následně se rozsuspendoval v 50 μ l rehydratačního pufru.

4.2.6. Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla zjištěna spektrofotometricky podle metody Bradfordové (1976).

- 29) Do plastové spektrofotometrické kyvety se napipetovalo 198 μ l destilované vody a 2 μ l vzorku.
- 30) Poté se do kyvety připipetovalo 800 μ l činidla Bradfordové.
- 31) Směs v kyvetě byla promíchána pipetou a inkubována po dobu 15 minut.
- 32) Po inkubaci bylo provedeno spektrofotometrické měření při vlnové délce 595 nm.

4.2.7. 2-DE - Izoelektrická fokusace a úprava proteinů

- 33) Podle získané absorbance vzorku byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku (viz Výpočet č. 1).
- 34) Na jeden IPG proužek se nanese 80 µg proteinů ve 125 µl rehydratačního pufru. Objem vzorků získaný podle Výpočtu č. 2 byl odebrán z jednotlivých vzorků do nových plastových mikrozkušavek tak, aby výsledné množství proteinů na IPG proužku bylo 80 µg. K tomuto vypočítanému objemu byl přidán rehydratační pufr, aby výsledný objem směsi byl 122,5 µl.
- 35) Ke vzorku bylo připipetováno 1,5 µl roztoku amfolytů a 1 µl bromfenolové modři do výsledného objemu 125 µl směsi.
- 36) Vzorek byl aplikován na IPG proužek volnou difuzí přes noc při laboratorní teplotě.
- 37) Další den byl IPG proužek se vzorkem vložen do jamky porcelánové desky fokusátoru a překryt minerálním olejem.
- 38) Poté byl IPG proužek připevněn a byla spuštěna izoelektrická fokusace podle nastaveného programu (Program EttanIPGphor3: 1. konstantní napětí 300 V po dobu 40 min., 2. gradientové zvýšení napětí na 1000 V za 27 min., 3. gradientové zvýšení na 5000 V za 90 min. a 4. konstantní napětí 5000 V po dobu 84 min.).
- 39) Po fokusaci byl IPG proužek inkubován 15 minut v ekvilibračním pufru 1 na překlopné míchačce, a následně 15 minut v ekvilibračním pufru 2 za účelem redukce a alkylace disulfidových vazeb u aminokyselin v proteinovém vzorku.

4.2.8. 2-DE - Příprava polyakrylamidového gelu a dvourozměrné SDS-PAGE elektroforézy

- 40) Pečlivě vyčištěná skla byla sestavena do aparatury pro přípravu polyakrylamidového gelu.
- 41) Podle tab. I byl v digestoři připraven roztok 12% polyakrylamidového gelu, který byl poté nalit mezi skla v aparatuře.
- 42) Gel byl převrstven malým objemem isopropanolu pro vyrovnání hladiny a ponechán tuhnout po dobu 1 hodiny.
- 43) Z gelu se odstranil isopropanol a IPG proužek byl opatrně vložen do aparatury mezi skla tak, aby těsně přiléhal ke gelu.
- 44) K IPG proužku se do aparatury vložil proteinový marker na detekci molekulové hmotnosti.

- 45) Dále byl připipetován roztok 0,5% agarosy s bromfenolovou modří o teplotě 60 °C do aparatury tak, aby překryl a imobilizoval IPG proužek těsně při gelu a nechal se ztuhnout.
- 46) Skla s imobilizovanými IPG proužky a ztuhlymi gely byly připevněny do elektroforetické aparatury a ta byla vložena do nádoby pro elektroforézu.
- 47) Do nádoby byl přilít 1 litr „running“ pufru, nádoba se přikryla víkem, vložila do lednice a připojila ke zdroji napětí.
- 48) Elektroforéza byla spuštěna při 60 V, 400 mA.
- 49) Jakmile pruh bromfenolové modří se vzorky doputoval do polyakrylamidového gelu (10-15 minut) bylo použité napětí zvýšeno na 100 V. Elektroforéza se ukončila, když vzorky s bromfenolovou modří doputovaly na spodní okraj polyakrylamidového gelu.
- 50) Po elektroforéze byly gely promývány na překlopné míchače 3x destilovanou vodou každých 5 minut.
- 51) Následně byly gely přes noc barveny roztokem barviva Coomasie Brilliant Blue G-250 za neustálého míchání na překlopné míchače.
- 52) Další den byly gely promývány destilovanou vodou každých 5 minut po dobu minimálně 2 hodin.
- 53) Gely byly naskenovány do počítače denzitometrickým dokumentačním skenerem a následně vyhodnocovány v softwaru PDQuest (Bio-Rad, USA).

4.2.9. Vyhodnocení výsledků

Fenotyp rostlin byl vyhodnocován z fotografií rostlin pomocí softwaru ImageJ 1,47t. Pro vyhodnocení získaných dvourozměrných proteinových map byl použit software PDQuest verze 8.0.1, build 055 (Bio-Rad, USA).

Tab. I: Příprava 12% polyakrylamidového gelu

	Objem (ml)
dH ₂ O	4,35
40% akrylamid	3,0
1,5M Tris HCl pH8,8	2,5
10% SDS	0,1
TEMED	0,005
10% APS	0,05
Celkový objem (ml)	10

Tab. II: Absorbance vzorků získané spektrofotometrickým měřením při 595 nm.

Vzorek	Naměřené absorbance	Průměrná absorbance
1S	0,510	0,496
	0,481	
1C	0,468	0,370
	0,272	
2S	0,316	0,309
	0,302	
2C	0,239	0,234
	0,228	
3S	0,303	0,417
	0,530	
3C	0,148	0,178
	0,207	

S – reprezentativní proteinový vzorek stresovaných rostlin, C – reprezentativní proteinový vzorek kontrolních rostlin. 1-3: typ biologického opakování.

Podle kalibrační křivky byly z průměrných absorbancí vypočítány koncentrace proteinů ve vzorcích.

Kalibrační křivka: $y = 0,0606x + 0,0596$

y – absorbance x – koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]

Výpočet č. 1:

Vzorek 1S: $x = (0,4955 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 7,20 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 3,60 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorek 1C: $x = (0,370 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 5,12 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 2,56 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorek 2S: $x = (0,309 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 4,12 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 2,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorek 2C: $x = (0,236 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 2,91 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 1,45 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorek 3S: $x = (0,417 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 5,90 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 2,95 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorek 3C: $x = (0,178 - 0,0596)/0,0606$
 $x = 1,95 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$
 $x = 0,97 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Pro další práci bylo třeba přepočítat objemy s rozpuštěnými proteiny tak, aby na IPG proužek bylo aplikováno 80 μg proteinů.

Výpočet č. 2:

Vzorek 1S: $80/3,60 = \underline{\underline{22,20 \mu\text{l}}}$

Vzorek 1C: $80/2,56 = \underline{\underline{31,25 \mu\text{l}}}$

Vzorek 2S: $80/2,06 = \underline{\underline{38,83 \mu\text{l}}}$

Vzorek 2C: $80/1,45 = \underline{\underline{55,17 \mu\text{l}}}$

Vzorek 3S: $80/2,95 = \underline{\underline{27,12 \mu\text{l}}}$

Vzorek 3C: $80/0,97 = \underline{\underline{82,47 \mu\text{l}}}$

5. Výsledky

Z materiálových a časových důvodů nebyl splněn cíl práce zavedení pěstování transgenní linie ječmene HvMPK3 v hydroponických podmínkách.

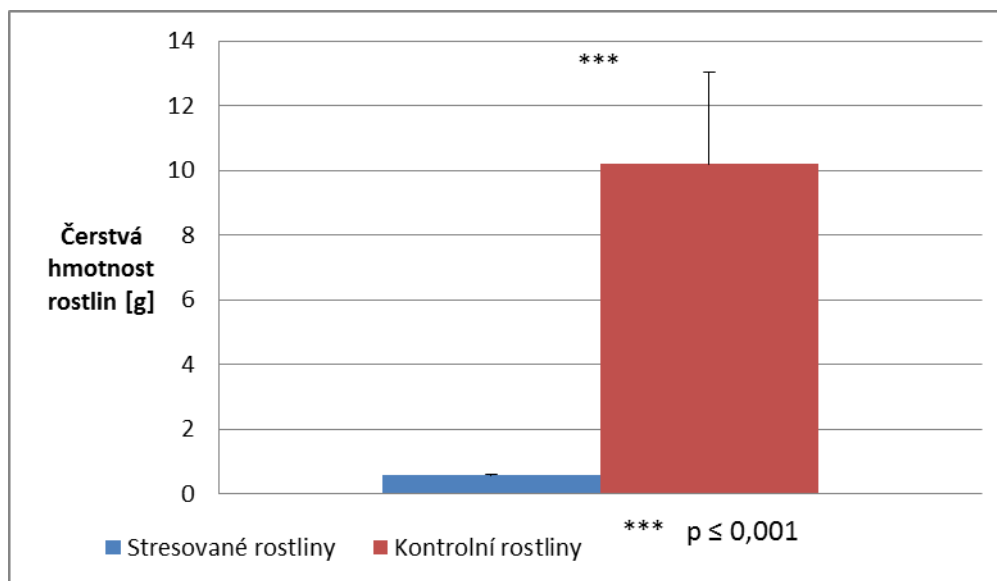
5.1. Fenotypová charakterizace ječmene v chladovém stresu

Fenotypové změny u Ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise byly sledovány po aplikaci chladového stresu při 2 °C po dobu 23 dnů. Pro porovnání rozdílů u stresovaných a kontrolních rostlin byly napěstovány tři biologická opakování, z nichž naměřené výsledky byly poté zkompletovány. Po 23 dnech působení chladového stresu jsme porovnávali fenotyp stresovaných rostlin oproti fenotypu kontrolních rostlin pěstovaných při standardních podmínkách (při 22 °C) na základě několika parametrů a to čerstvé hmotnosti jednotlivých rostlin, délky a průměrného počtu jejich kořenů. U rostlin vystavených chladovému stresu došlo ve všech opakováních k silnému potlačení, či až k zastavení růstu rostlin. Oproti kontrolním rostlinám měly stresované rostliny mnohem méně rozvinutý kořenový systém. Počet a délka adventivních kořenů u stresovaných rostlin se od začátku působení stresu téměř nezměnili a rostliny tvořily malé množství bočních kořenů o krátké délce. Kontrolní rostliny vysoce převyšovaly stresované jak počtem, tak délkou adventivních kořenů. Stejný rozdíl bylo možno pozorovat u bočních kořenů kontrolních rostlin, které opět jak počtem tak i délkou vysoce převyšovaly boční kořeny stresovaných rostlin. Dále byly nadzemní části stresovaných rostlin tvořeny ve všech případech jen jedním stonkem se dvěma listy, kdežto u kontrolních rostlin můžeme pozorovat velké množství stonkových odnoží s větším počtem vytvořených listů. Nejpravděpodobnějším vysvětlením těchto pozorovaných rozdílů je fakt, že chladový stres způsobuje inhibici růstu a dělení rostlinných buněk, což se navenek projeví zakrslostí celé rostliny a jejich orgánů (viz obr. 2).



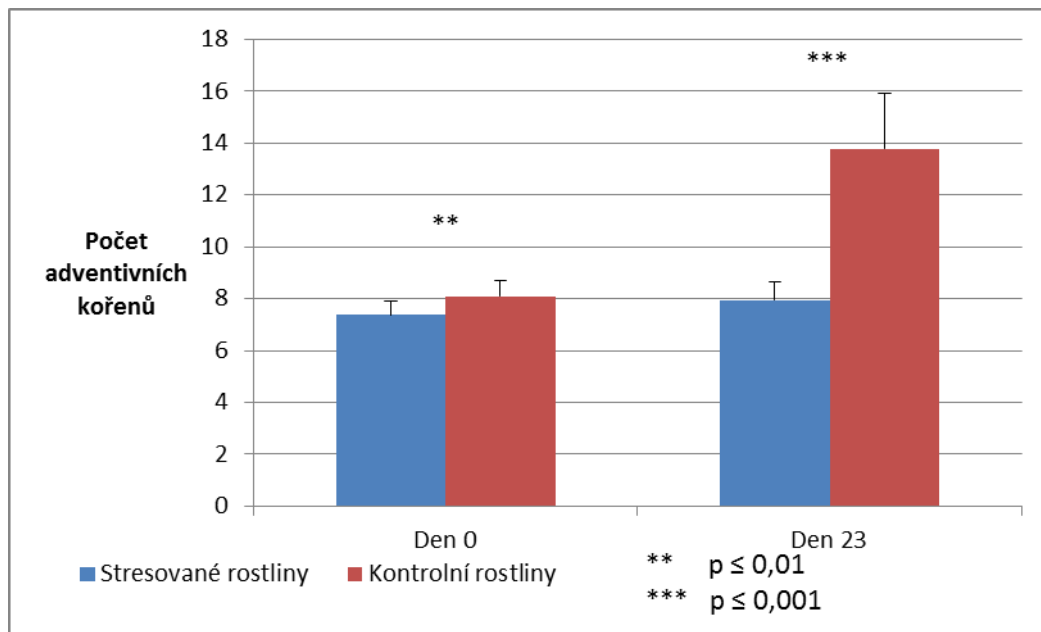
Obr. 2: Rostlina ve 23. den experimentu rostoucí při chladovém stresu 2 °C (A) a rostlina rostoucí při kontrolních podmínkách 22 °C (B).

Prvním hodnoceným parametrem byla čerstvá hmotnost rostlin. Stresované i kontrolní rostliny byly váženy ihned po ukončení experimentu tedy po 23 dnech působení stresu. Na obr. 3 lze vidět rozdíl v průměrné čerstvé hmotnosti stresovaných a kontrolních rostlin, kde průměrná čerstvá hmotnost kontrolních rostlin vykazuje téměř 20x vyšší hodnotu než průměrná čerstvá hmotnost stresovaných rostlin. Tento vysoký rozdíl mezi průměrnými hmotnostmi byl důsledkem chladového stresu, který způsobil inhibici růstu a tvorby nových orgánů u stresovaných rostlin. Pomocí t-testu byl prokázán statisticky významný rozdíl v průměrné hmotnosti stresovaných a kontrolních rostlin na hladině 99,9 % ($p \leq 0,001$).



Obr. 3: Grafické porovnání průměrné čerstvé hmotnosti stresovaných a kontrolních rostlin. Modrou barvou je značena průměrná čerstvá hmotnost stresovaných rostlin a červenou barvou je značena průměrná čerstvá hmotnost kontrolních rostlin. Nad sloupci je vyznačena směrodatná odchylka. Hvězdičky představují statistické hladiny významnosti.

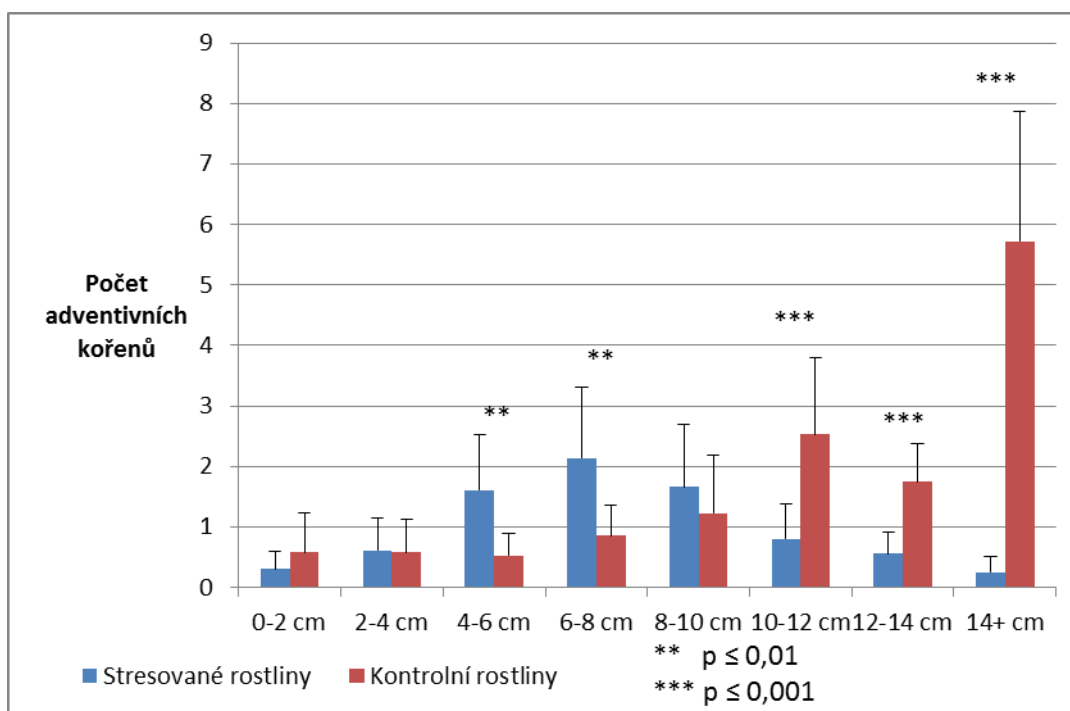
Dalším hodnoceným parametrem byl počet adventivních kořenů. Na obr. 4 lze vidět, že průměrný počet adventivních kořenů u všech rostlin se v den začátku experimentu pohyboval kolem 8 kořenů na jednu rostlinu. Zatímco u kontrolních rostlin v 23. den experimentu došlo k nárůstu průměrného počtu adventivních kořenů na 14 na rostlinu, u stresovaných rostlin se jejich počet téměř nezměnil. To bylo opět způsobeno chladovým stresem vyvolanou inhibicí růstu a dělení buněk, a tudíž zastavenou tvorbou nových rostlinných orgánů. Pomocí t-testu byl prokázán statisticky významný rozdíl v průměrném počtu kořenů v den 0 na hladině 99 % ($p \leq 0,01$) a rozdíl v průměrném počtu adventivních kořenů v den 23 na hladině 99,9 % ($p \leq 0,001$) mezi stresovanými a kontrolními rostlinami.



Obr. 4: Průměrný počet adventivních kořenů stresovaných a kontrolních rostlin v den 0 a v 23. den působení stresu. Modrou barvou je značen průměrný počet adventivních kořenů stresovaných rostlin a červenou barvou je značen průměrný počet adventivních kořenů kontrolních rostlin. Nad sloupci je vyznačena směrodatná odchylka. Hvězdičky představují statistické hladiny významnosti.

Třetím hodnoceným parametrem byl počet adventivních kořenů v určených délkových úsecích kořenového systému rostlin v 23. den experimentu. Délky jsme rozdělili do skupin po 2 cm pro lepší přehlednost. Protože velmi malý počet adventivních kořenů dosáhl u stresovaných rostlin délky více než 14 cm, určili jsme tuto délku jako horní mez. Vzhledem k vysoké variabilitě rostlin nebyly ve všech délkových úsecích pozorovány statisticky významné rozdíly. Z obr. 5 je viditelné, že v rozmezí délek 0-4 cm nebyl patrný rozdíl v průměrném počtu adventivních kořenů na rostlinu mezi stresovanými a kontrolními rostlinami. V rozmezí délek 4-10 cm v průměrném počtu adventivních kořenů převyšovaly stresované rostliny nad kontrolními, přičemž největší průměrný počet adventivních kořenů se u stresovaných rostlin vyskytoval v úseku 6-8 cm. Největší pozorovaný počet adventivních kořenů v tomto úseku u konkrétní stresované rostliny byl 8. V rozmezí 10-14 cm a více již jasně převyšovaly kontrolní rostliny svým průměrným počtem adventivních kořenů stresované rostliny. Nejvíce adventivních kořenů bylo u kontrolních rostlin v úseku 14+ cm a největší pozorovaný počet adventivních kořenů v tomto úseku u konkrétní rostliny byl 14. V úseku 4-6 cm a 6-8 cm byl pomocí t-testu prokázán statisticky významný rozdíl mezi průměrným počtem adventivních kořenů stresovaných a kontrolních rostlin na hladině 99 % ($p \leq 0,01$). V úseku 10-12 cm, 12-14 cm a 14+ cm byl pomocí t-testu prokázán statisticky významný rozdíl mezi průměrným počtem adventivních kořenů stresovaných a kontrolních

rostlin na hladině 99,9 % ($p \leq 0,001$). V úseku 0-2 cm, 2-4 cm a 8-10 cm nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi průměrným počtem adventivních kořenů stresovaných a kontrolních rostlin.



Obr. 5: Průměrný počet adventivních kořenů v různých délkách stresovaných a kontrolních rostlin v 23. den působení stresu. Modře je značen průměrný počet adventivních kořenů u stresovaných rostlin a červeně je značen průměrný počet adventivních kořenů u kontrolních rostlin. Nad sloupci je vyznačena směrodatná odchylka. Hvězdičky představují statistické hladiny významnosti.

5.2. Proteomická analýza

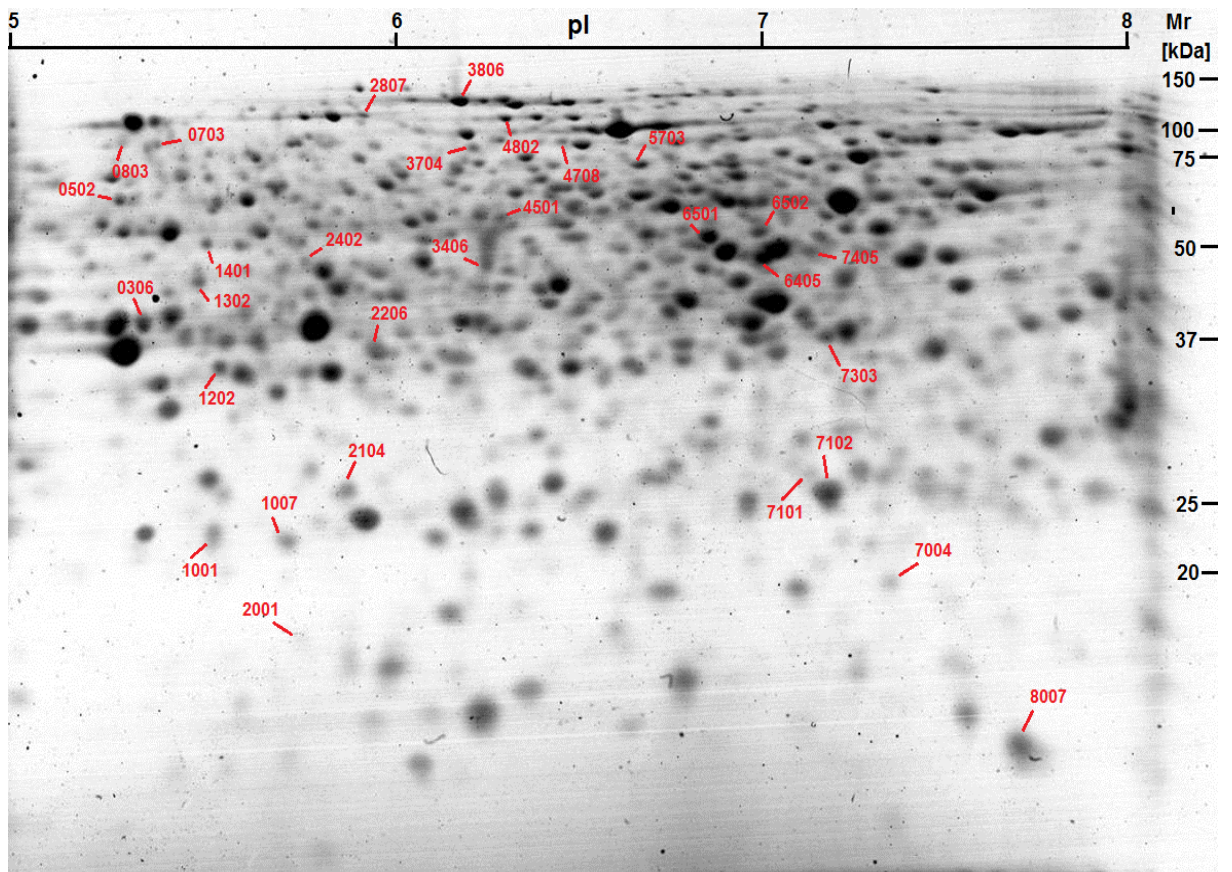
Pomocí dvourozměrné elektroforézy byly detekovány kvantitativní změny v proteomu kořenových buněk stresovaných a kontrolních rostlin. Oskenované dvourozměrné proteinové mapy stresovaných a kontrolních rostlin ze všech opakování byly spolu vyhodnocovány v softwaru PDQuest verze 8.0.1, build 055 (Bio-Rad, USA). Hodnotícím parametrem proteomické analýzy byla změna optické denzity jednotlivých proteinových skvrn. Optická denzita proteinových skvrn z 2D gelů kontrolních rostlin sloužila jako standard, se kterým se porovnávala optická denzita proteinových skvrn z 2D gelů stresovaných rostlin. 2D gel kontrolní rostliny s nejvyšším počtem detekovaných skvrn (gel s názvem Kontrola2) byl zvolen jako tzv. Master gel, k jehož skvrnám se následně přiřazovaly skvrny ostatních 2D gelů.

Přehled detekovaných skvrn, spárovaných skvrn mezi gely stresovaných a kontrolních rostlin a procentuální shoda jednotlivých gelů vůči Master gelu jsou znázorněny v tab. III. Obr. 6 zobrazuje vybranou proteinovou mapu stresovaných rostlin. V mapách stresovaných rostlin bylo průměrně detekováno 392 skvrn. Obr. 7 zobrazuje vybranou proteinovou mapu kontrolních rostlin. V mapách kontrolních rostlin bylo průměrně detekováno 414 skvrn.

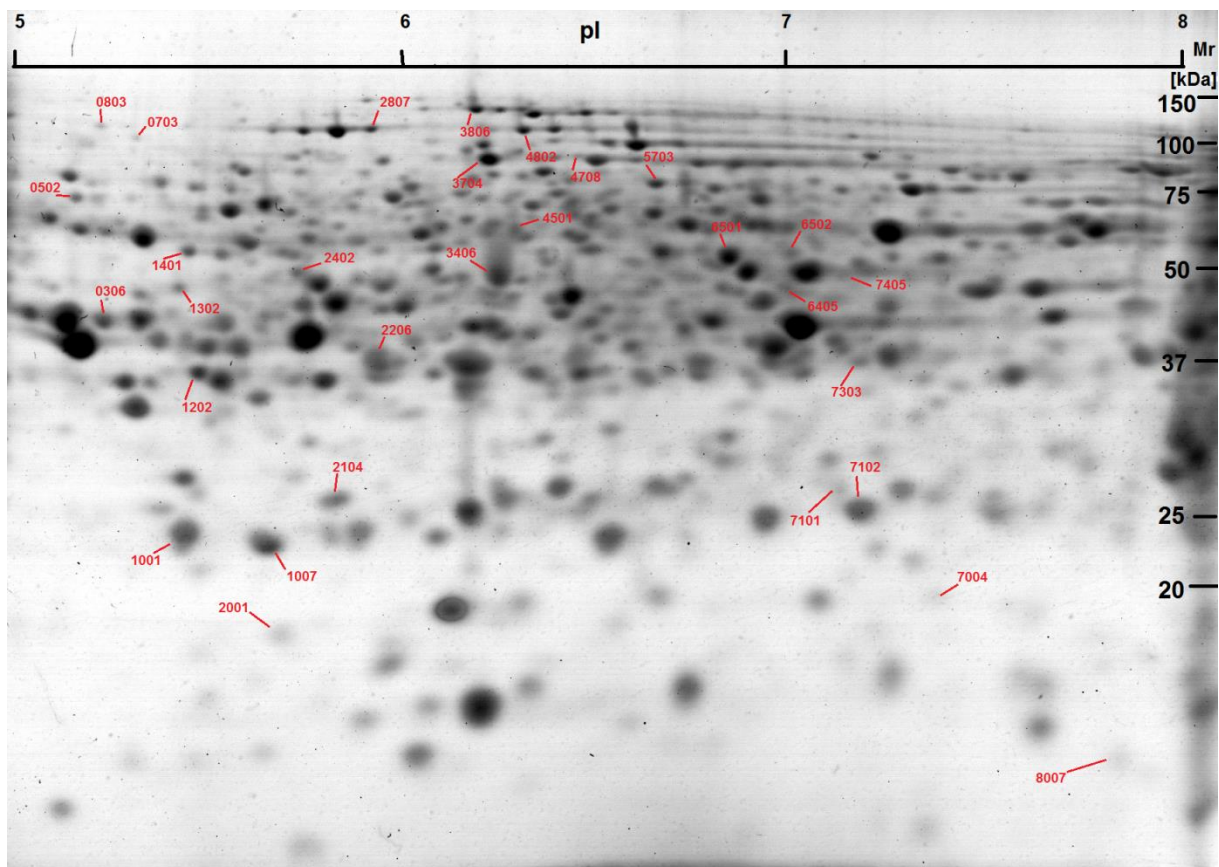
Tab. III: Přehled detekovaných, spárovaných skvrn a procentuální shoda jednotlivých 2D gelů vůči Master gelu. Názvy gelů odpovídají typům rostlin, ze kterých byl získán proteinový extrakt.

Název gelu	Biologické opakování	Počet detekovaných skvrn	Počet spárovaných skvrn	Procentuální shoda
Stres1	1.	338	328	97 %
Stres2	2.	411	400	97 %
Stres3	3.	428	418	97 %
Kontrola1	1.	350	348	99 %
Kontrola2	2.	458	458	100 %
Kontrola3	3.	435	432	99 %

Stres – gel stresované rostliny, Kontrola – gel kontrolní rostliny



Obr. 6: Vybraná proteinová mapa získaná z kořenových buněk stresovaných rostlin. Vodorovné měřítko zobrazuje hodnotu izoelektrického bodu (pI) a svislé měřítko zobrazuje molekulovou hmotnost (Mr) v kDa.



Obr. 7: Vybraná proteinová mapa získaná z kořenových buněk kontrolních rostlin. Vodorovné měřítko zobrazuje hodnotu izoelektrického bodu (pI) a svislé měřítko zobrazuje molekulovou hmotnost (Mr) v kDa.

Na základě změny optické denzity byly jednotlivé proteinové skvrny rozděleny do šesti skupin. Nejvyšší počet proteinových skvrn se vyskytoval ve skupině, u které došlo k 1,1 až 1,5 násobnému zvýšení optické denzity (89). Naopak nejnižší počet proteinových skvrn obsahovala skupina, u které došlo ke 3 a vícenásobnému snížení optické denzity (18). Zbytek proteinových skvrn (90), u kterých změna optické denzity nedosáhla ani 1,1 násobné změny nebyl zařazen do žádné skupiny. Počet vyskytovaných proteinových skvrn ve skupinách vykazoval nepřímou úměrnost s velikostí změny optické denzity (viz tab. IV).

Tab. IV: Přehled proteinových skvrn rozdělených do 6 skupin na základě změny jejich optické denzity způsobené chladovým stresem.

Změna optické denzity	Skupiny podle velikosti změny optické denzity	Počet detekovaných skvrn ve skupině
Zvýšení	$\geq 3x$	19
	3-1,5x	76
	1,5-1,1x	89
Snížení	1,1-1,5x	87
	1,5-3x	79
	$\geq 3x$	18

Pomocí t-testu bylo mezi 2D gely stresovaných a kontrolních rostlin následně určeno na hladině významnosti 90 % ($p \leq 0,1$) 61 statisticky významných proteinových skvrn a na hladině významnosti 95 % ($p \leq 0,05$) bylo určeno 30 statisticky významných proteinových skvrn. U těchto 30 proteinových skvrn byla dále určena orientační molekulová hmotnost podle proteinového markeru Protein plus standards a orientační hodnota izoelektrického bodu podle pevného imobilizovaného pH gradientu na IPG stripu (viz tab. V).

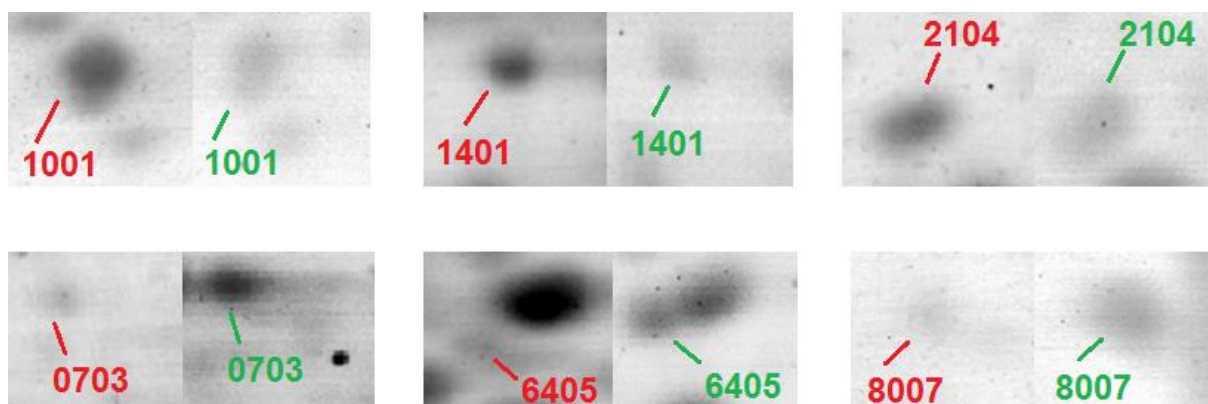
Tab. V: Přehled statisticky významných proteinových skvrn na hladině významnosti 95 % a jejich orientačně určené hodnoty izoelektrického bodu, molekulové hmotnosti a změna optické denzity.

Proteinová skvrna	Izoelektrický bod	Molekulová hmotnost [kDa]	Změna optické denzity
Ssp0306	5,25	44	Zvýšení 1,69x
Ssp0502	5,16	75	Zvýšení 1,35x
Ssp0703	5,32	130	Zvýšení 3,98x
Ssp0803	5,23	150	Zvýšení 3,23x
Ssp1001	5,44	24	Snížení 3,32x
Ssp1007	5,66	23	Snížení 2,45x
Ssp1202	5,48	36	Snížení 1,69x
Ssp1302	5,43	50	Zvýšení 1,36x
Ssp1401	5,46	58	Snížení 1,65x
Ssp2001	5,70	< 20	Snížení 3,88x

Tab. V: Přehled statisticky významných proteinových skvrn na hladině významnosti 95 % a jejich orientačně určené hodnoty izoelektrického bodu, molekulové hmotnosti a změna optické denzity.

Ssp2104	5,84	26	Snížení 1,59x
Ssp2206	5,94	37	Snížení 1,65x
Ssp2402	5,75	50	Snížení 3,57x
Ssp2807	5,94	150	Snížení 2,39x
Ssp3406	6,25	50	Snížení 2,41x
Ssp3704	6,23	100	Snížení 3,23x
Ssp3806	6,23	150	Snížení 1,83x
Ssp4501	6,30	66	Zvýšení 1,49x
Ssp4708	6,50	100	Zvýšení 1,87x
Ssp4802	6,33	150	Snížení 1,37x
Ssp5703	6,70	85	Snížení 1,60x
Ssp6405	7,00	49	Zvýšení 3,13x
Ssp6501	6,85	58	Snížení 1,31x
Ssp6502	7,00	60	Zvýšení 2,70x
Ssp7004	7,40	20	Zvýšení 1,77x
Ssp7101	7,14	27	Snížení 3,63x
Ssp7102	7,20	25	Zvýšení 1,77x
Ssp7303	7,19	36	Zvýšení 2,03x
Ssp7405	7,14	53	Zvýšení 4,73x
Ssp8007	7,86	< 20	Zvýšení 5,17x

Pro lepší přehlednost změn v optické denzitě byly u některých vybraných skvrn se statistickou hladinou významnosti 95 % provedeny detailní záběry na vybrané skvrny (viz obr. 8).



Obr. 8: Detailní záběry vybraných statisticky významných proteinových skvrn nalezených v tab. V. Červenými popisky jsou značeny skvrny z 2D gelů kontrolních rostlin a zelenými popisky skvrny z 2D gelů stresovaných rostlin.

6. Diskuze

Chladový stres nepříznivě ovlivňuje růst a vývoj rostlin, silně omezuje jejich prostorovou distribuci, zemědělskou produktivitu (Chinnusamy *et al.*, 2007) a schopnost rostlin odolávat tomuto typu stresu je velmi variabilní (Thomashow, 1998). Podle očekávání bylo u rostlin, které byly vystaveny chladovému stresu (2 °C) po dobu 23 dní pozorováno snížení jejich růstu a dalšího vývoje, což je způsobeno změnou rostlinného metabolismu, jehož primárním cílem se stává aklimatizace rostliny na nové podmínky (Kosová *et al.*, 2011). Stresované rostliny vykazovaly příznaky, o kterých hovoří několik článků. Například autoři článku Nahar *et al.*, (2009) zkoumali vliv chladového stresu na rýži seté (*Oryza sativa* L.) a zjistili, že stresované rostliny byly oproti kontrolním rostlinám zakrslé, netvořily nové odnože a docházelo také k částečnému schnutí jejich listů. Podobně Takáč (2004) při pokusech na kukuřici seté (*Zea mays* L.) pozoroval již po 5 dnech chladového stresu při 6 °C nekrózi na listech stresovaných rostlin. Stejně příznaky pozoroval také Yadav (2009) na rýži, která byla vystavena chladovému stresu 2 °C.

V praktické části práce se také zjistilo, že stresované rostliny měly oproti kontrolním rostlinám mnohem méně rozvinutý celý kořenový systém. Počet a délka adventivních kořenů stresovaných rostlin se od začátku působení stresu téměř nezměnili a tvořily malé množství bočních kořenů o krátké délce. Kontrolní rostliny vysoce převyšovaly stresované jak počtem, tak délkou adventivních kořenů. Stejný rozdíl bylo možno pozorovat u bočních kořenů kontrolních rostlin, které opět jak počtem tak i délkou vysoce převyšovaly boční kořeny stresovaných rostlin. Zpomalení až inhibice růstu kořenů je mimo jiné způsobena blokadou auxinového transportu, který je důležitým růstovým hormonem (Shibasaki *et al.*, 2009), a také jeho sníženou akumulací v meristematických buňkách, což má za následek represí dělení těchto buněk a tím snížení jejich počtu a velikosti meristémů (Zhu *et al.*, 2015). Pozorovanou inhibicí tvorby nových kořenů u stresovaných rostlin v našem experimentu potvrzují pokusy Alvarez-Uria *et Körnera* (2007), ve kterých autoři testovali vícero rostlin na chladový stres v rozmezí teplot 2-16 °C. Při teplotě pod 9 °C vytvořily rostliny pouze 15 % nových kořenů z celkového počtu a při teplotě pod 6 °C vytvořily již pouze 3 % nových z celkového počtu kořenů. Inhibici růstu kořenů stresovaných rostlin potvrzuje také práce Equiza *et al.* (1997), kteří zjistili, že chladový stres (5 °C) u různých odrůd pšenice zpomaluje růst kořenů o 60-70 %.

Proteiny jsou hlavními funkčními látkami, které jsou důležité při obraně rostlin (Kosová *et al.*, 2014). Účastní se mnoha metabolických drah, takže předpokladem je, že pokud v chladovém stresu dochází ke změně metabolismu, odrazí se to také na změně proteomu, konkrétně na změně abundance proteinů (Kosová *et al.*, 2011).

V tomto experimentu bylo detekováno 30 proteinových skvrn z kořenů ječmene setého, odrůdy Golden Promise, na statistické hladině významnosti 95 % ($p \leq 0,05$), z nichž 16 vykazovalo sníženou abundanci a 14 vykazovalo zvýšenou abundanci podle měření změny optické denzity proteinových skvrn. V internetových databázích nebyla nalezena dostupná literatura, která by popisovala proteomickou analýzu kořenového systému ječmene setého v podmínkách chladového stresu. Amme *et al.* (2006) analyzovali proteom listů *Arabidopsis thaliana* v chladovém stresu (6 °C) a pozorovali 22 proteinových skvrn s alespoň dvojnásobnou změnou abundance oproti kontrolním rostlinám. 18 skvrn vykazovalo zvýšenou a 4 skvrny sníženou abundanci. Cui *et al.* (2005) zase analyzovali proteom listů rýže v chladovém stresu (5 °C) a pozorovali 22 proteinových skvrn s 1,5-2x zvýšenou abundancí a 38 proteinových skvrn s více než 2x zvýšenou abundancí.

Podobnou práci na ječmeni je experiment Hlaváčkové *et al.*, (2013), ve kterém autoři testovali odrůdu ječmene setého, Luxor, na chladový stres. V této práci dělali autoři proteomickou analýzu bazální části rostliny a listů. Vytvořili dvourozměrné gely, ve kterých detekovali proteinové skvrny v rozmezí izoelektrického bodu 4-7. Detekovali kolem 700 proteinů z bazální části rostlin. Z těchto 700 proteinů byla zjištěna více než 2x změněná abundance u 90 proteinů stresovaných rostlin. V listech autoři detekovali kolem 600 proteinů, u 63 byla zjištěna více než 2x změněná abundance. Porovnáním parametrů molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu získaných proteinových skvrn z proteomické analýzy bylo nalezeno 5 proteinových skvrn, které by teoreticky mohly odpovídat proteinům, které identifikovali autoři v práci Hlaváčkové *et al.*, (2013). Tyto proteinové skvrny jsou uvedeny v tab. VI.

Tab. VI: Porovnání zjištěných výsledků proteomické analýzy s literaturou Hlaváčková *et al.* (2013). Sloupce vlevo obsahují proteinové skvrny z proteomické analýzy z předkládané bakalářské práce a sloupce vpravo obsahují proteinové skvrny z literatury Hlaváčková *et al.* (2013).

Číslo skvrny	Mr [kDa]/pI	Změna abundance	Číslo skvrny	Mr [kDa]/pI	Změna abundance
Ssp0703	130/5,32	3,98x	2814	136/5,4	< 2x
Ssp1202	36/5,48	1,69x	2108	35/5,3	< 2x
Ssp2206	37/5,94	1,65x	4110	36/5,9	< 2x
Ssp3704	100/6,23	3,23x	5716	104/6,1	< 2x
Ssp5703	85/6,70	1,60x	5611	89/6,7	< 2x

Ssp – proteinová skvrna, Mr – molekulová hmotnost, pI – izoelektrický bod

Skvrna 2814 může odpovídat vakuolární proton-ATPáze (gi|11527563, Q9FS11), jejíž biologickou funkcí je udržování pH uvnitř buňky (Nishi *et al.*, 2002; Hlaváčková *et al.*, 2013). Skvrna 2108 může odpovídat predikovanému proteinu (gi|326504940, F2EHD9), který je zapojen do odpovědi na chladový stres (Matsumoto *et al.*, 2011; Hlaváčková *et al.*, 2013). Skvrna 4110 může odpovídat hypotetickému proteinu SORBIDRAFT_06g029250 (gi|242074406, C5YG90) identifikovaném v organismu *Sorghum bicolor*, který je zapojen do obrany organismu (Patterson *et al.*, 2009; Hlaváčková *et al.*, 2013). Skvrna 5716 může odpovídat neznámému proteinu identifikovaném v *Zea mays* (gi|194707130, B4FZV6), který je zapojen v katabolických procesech (Soderlund *et al.*, 2009; Hlaváčková *et al.*, 2013). Skvrna 5611 může odpovídat isocitrát dehydrogenáze (gi|326493350, F2CQL5), která katalyzuje oxidaci isocitrátu v Krebsově cyklu (Hlaváčková *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2014).

Fenotypová analýza ječmene po chladovém stresu ukázala značné rozdíly mezi stresovanými rostlinami a kontrolními rostlinami hlavně v mohutnosti celého kořenového systému, v počtu i délce adventivních a bočních kořenů. Změny byly evidentní také u nadzemní části rostlin. Bohužel tyto změny se nepodařilo lépe kvantifikovat pomocí dostupných softwarových aplikací. Podobné fenotypové projevy vlivu chladového stresu na rostliny již dříve pozorovali autoři publikací Equiza *et al.* (1997) u pšenice, Takáč (2004) u kukuřice a Nahar *et al.*, (2009) u rýže.

Na základě výsledků získaných z proteomické analýzy a jejich porovnáním s jinými experimenty, zejména s prací Hlaváčkové *et al.* (2013) se můžeme domnívat, že při chladovém stresu u ječmene došlo ke zvýšené tvorbě proteinů zapojených do odpovědi na vyvolaný abiotický stres a rostliny následně v chladovém stresu změnilly svůj metabolismus. Tato hypotéza je v souladu s pozorovanými fenotypovými změnami u stresovaných rostlin. Avšak definitivní potvrzení předpokladů o zvýšeném výskytu proteinů, které souvisí s reakcí ječmene na chladový stres je možné pouze po identifikaci všech diferencially změněných proteinových skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie.

7. Závěr

Teoretická část této bakalářské práce pojednává o vlivu stresových podmínek na rostliny, s větším zaměřením na chladový stres, jeho vliv na proteom rostlin a signalizaci chladového stresu.

Praktická část bakalářské práce se zabývá sledováním fenotypových změn u Ječmene setého po aplikaci chladového stresu (2 °C) po dobu 23 dní a porovnání těchto změn s fenotypem kontrolních rostlin. Dále se tato část zabývá proteomickou analýzou kořenového systému Ječmene setého po aplikaci chladového stresu, na základě porovnávání detekovaných proteinů u stresovaných a kontrolních rostlin.

Vyhodnocením fenotypových změn po 23 dnech experimentu bylo zjištěno, že chladový stres způsobuje téměř úplné zastavení růstu jak nadzemní části rostlin tak i jejich kořenového systému. Stresované rostliny tvořily malý počet stonkových odnoží a dorůstaly malých délek, tvořily malý počet adventivních a bočních kořenů, které taktéž dorůstaly pouze malých délek oproti silně větvenému kořenovému systému a rozvinuté nadzemní části kontrolních rostlin. To se projevilo výrazně na hmotnosti rostlin, která byla u stresovaných rostlin několikanásobně nižší než u kontrolních rostlin.

Pomocí metody dvourozměrné elektroforézy a softwaru PDQuest byla provedena proteomická analýza kořenového systému stresovaných a kontrolních rostlin. Byly vytvořeny dvourozměrné proteinové mapy, které se následně porovnávaly mezi sebou. Mezi 31 detekovanými proteinovými skvrnami v proteinových mapách stresovaných a kontrolních rostlin byla zjištěna statisticky významná změna optické denzity na hladině 95 % ($p \leq 0,05$). Z 2D gelů stresovaných rostlin bylo u 14 skvrn pozorováno zvýšení a u 16 skvrn naopak snížení optické denzity oproti skvrnám kontrolních rostlin. Pro definitivní potvrzení a identifikaci proteinů z těchto skvrn je nutné využít hmotnostní spektrometrii.

8. Literatura

Internetové stránky:

1. Farming. *Statista*. [online]. © 2015 [cit. 2015-06-11]. Dostupné z: <http://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/>

Publikace:

2. Abass, M.; Morris, P. C. The *Hordeum vulgare* signalling protein MAP kinase 4 is a regulator of biotic and abiotic stress responses. *Journal of Plant Physiology* 2013;170:1353-1359
3. Agard, N. J.; Mahrus, S.; Trinidad, J. C.; Lynn, A.; Burlingame, A. L.; Wells, J. A. Global kinetic analysis of proteolysis via quantitative targeted proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:1913-1918
4. Ahamed, A.; Murai-Hatano, M.; Ishikawa-Sakura, J.; Hayashi, H.; Kawamura, Y.; Uemura, M. Cold stress-induced acclimation in rice is mediated by root-specific aquaporins. *Plant & Cell Physiology* 2012;53:1445-1456
5. Alberts, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 1998;92:291-294
6. Alvarez-Uria, Körner, C. Low temperature limits of root growth in deciduous and evergreen temperate tree species. *Functional Ecology* 2007;21:211-218
7. Amasino, R. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* 2004;16:2553-2559
8. Amme, S.; Matros, A.; Schlesier, B.; Mock, H.-P. proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany* 2006;57:1537-1546
9. Baldi, P.; Grossi, M.; Pecchioni, N.; Vale, G.; Cattivelli, L. High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. *Plant Molecular Biology* 1999;41:233-243
10. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254

11. Bravo, L. A.; Gallardo, J.; Navarrete, A.; Olave, N.; Martínez, J.; Alberdi, M.; Close, T. J.; Corcuera, L. J. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum* 2003;118:262-269
12. Busconi, M.; Dal Bosco, C.; Crosatti, C.; Baldi, P.; Mare, C.; Grossi, M. Mastrangelo, A. M.; Rizza, F.; Cattivelli, L.; Stanca, A. M. The cold-regulated genes are involved in the physiological response of barley to cold environment. *Iceland Agricultural Sciences* 2001;14:17-27
13. Cattivelli, L. *et* Bartels, D. Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Physiology* 1990;93:1504-1510
14. Chen, J.; Tian, L.; Xu, H.; Tian, D.; Luo, Y.; Ren, C.; Yang, L.; Shi, J. Cold-induced changes of protein and phosphoprotein expression patterns from rice roots as revealed by multiplex proteomic analysis. *Journal of Plant Biology & Omics* 2012;5:194-199
15. Chinnusamy, V.; Zhu, J.; Zhu, J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 2007;12:1360-1385
16. Chinnusamy, V.; Zhu, J. K.; Sunkar, R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology* 2010;639:39-55
17. Chmelik, J. Proteomic guide. *Chemické Listy* 2005;99:883-885
18. Choi, D. W.; Rodriguez, E. M.; Close, T. J. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiology* 2002;129:1781-1787
19. Collins, H. M.; Burton, R. A.; Topping, D. L.; Liao, M.-L.; Bacic, A.; Fincher, G. B. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry* 2010;87:272-282
20. Cramer, G. R. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2010;16:86-93
21. Cramer, G. R.; Urano, K.; Delrot, S.; Pezzotti, M.; Shinozaki, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 2011;11:163
22. Crosatti, C.; Soncini, C.; Stanca, A. M.; Cattivelli, L. The accumulation of a cold-regulated chloroplastic protein is light-dependent. *Planta* 1995;196:458-463
23. Cui, S.; Huang, F.; Wang, J.; Ma, X.; Cheng, Y.; Liu, J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 2005;5:3162-3172
24. Ding, J. P.; Pickard, B. G. Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *The Plant Journal* 1993;3:713-720

25. Dyson, T. World food trends and prospects to 2025. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:5929-5936
26. Equiza, M. A.; Miravé, J. P.; Tognetti, J. A. Differential inhibition of shoot vs. root growth at low temperature and its relationship with carbohydrate accumulation in different wheat cultivars. *Annals of Botany* 1997;80:657-663
27. Forster, B. P. Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* 2001;120:317-328
28. Gilmour, S. J.; Zarka, D. G.; Stockinger, E. J.; Salazar, M. P.; Houghton, J. M.; Thomashow, M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal* 1998;16:433-442
29. Gilmour, S. J.; Fowler, S. G.; Thomashow, M. F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 2004;54:767-781
30. Goda, H.; Sasaki, E.; Akiyama, K.; Maruyama-Nakashita, A.; Nakabayashi, K.; Li, W.; Ogawa, M.; Yamauchi, Y.; Preston, J.; Aoki, K.; Kiba, T.; Takatsuto, S.; Fujioka, S.; Asami, T.; Nakano, T.; Kato, H.; Mizuno, T.; Sakakibara, H.; Yamaguchi, S.; Nambara, E.; Kamiya, Y.; Takahashi, H.; Hirai, M. Y.; Sakurai, T.; Shinozaki, K.; Saito, K.; Yoshida, S.; Shimada, Y. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal* 2008;55:526-542
31. Görg, A.; Postel, W.; Weser, J.; Günther, S.; Strahler, J. R.; Hanash, S. M.; Somerlot, L. Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension in the presence of nonionic detergent. *Electrophoresis* 1987;8:45-51
32. Gygi, S. P.; Corthals, G. L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97:9390-9395
33. Hanano, A.; Burcklen, M.; Flenet, M.; Ivancich, A.; Louwagie, M.; Garin, J.; Blee, E. Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281:33140-33151
34. Hanin, M.; Brini, F.; Ebel, C.; Toda, Y.; Takeda, S.; Masmoudi, K. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signalling & Behavior* 2011;6:1503-1509

35. Heukeshoven, J.; Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985;6:103-112
36. Hiller-Sturmhöfel, S.; Sobin, J.; Mayfield, R. D. Proteomic approaches for studying alcoholism and alcohol-induced organ damage. *Alcohol Research & Health* 2008;31:36-48
37. Hlaváčková, I.; Vítámvás, P.; Santrůček, J.; Kosová, K.; Zelenková, S.; Prášil, I. T.; Ovesná, J.; Hynek, R.; Kodíček, M. Proteins involved in distinct phases of cold hardening process in frost resistant winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv Luxor. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14:8000-8024
38. Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station* 1950;347:1-32
39. Hurkman, WJ *et* Tanaka, CK. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant physiology* 1986;81:802-806
40. Hurkman, W. J. *et* Tanaka, C. K. The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiology* 1987;83:517-524
41. Jaglo, K. R.; Kleff, S.; Amundsen, K. L.; Zhang, X.; Haake, V.; Zhang, J. Z.; Deits, T.; Thomashow, M. F. components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 2001;127:910-917
42. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I. T. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Plant Science* 2004;180:46-52
43. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I. T.; Renaut, J. Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics* 2011;74:1301-1322
44. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášilová, P.; Prášil, I. T. Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum* 2013;57:105-112
45. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I. T. Proteomics of stress responses in wheat and barley – search for potential protein markers of stress tolerance. *Plant Science* 2014;5:711-725
46. Kovářová, H. Proteomics in Postgenome Era. *Chemické Listy* 2005;99:886-889

47. Kratsch, H. A.; Graves, W. R.; Gladon, R. J. Aeroponic system for control of root-zone atmosphere. *Environmental and Experimental Botany* 2006;55:70-76
48. Kvasnicka, F. Proteomics: General strategies and application to nutritionally relevant proteins. *Journal of Chromatography* 2003;787:77-89
49. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
50. Lee, B.; Henderson, D. A.; Zhu, J. K. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell* 2005;17:3155-3175
51. Li, C. R.; Liang, D. D.; Xu, R. F.; Li, H.; Zhang, Y. P.; Qin, R. Y.; Li, L.; Wei, P. C.; Yang, J. B. Overexpression of an alternative oxidase gene, *OsAOX1a*, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. *Genetics and Molecular Research* 2013;12:5424-5432
52. Ma, Q.; Dai, X.; Xu, Y.; Guo, J.; Liu, Y.; Chen, N.; Xiao, J.; Zhang, D.; Xu, Z.; Zhang, X.; Chong, K. Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiology* 2009;150:244-256
53. Matsumoto, T.; Tanaka, T.; Sakai, H.; Amano, N.; Kanamori, H.; Kurita, K.; Kikuta, A.; Kamiya, K.; Yamamoto, M.; Ikawa, H.; Fujii, N.; Hori, K.; Itoh, T.; Sato, K. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant physiology* 2011;156:20-28
54. Matsuoka, D.; Nanmori, T.; Sato, K.; Fukami, Y.; Kikkawa, U.; Yasuda, T. Activation of AtMEK1 an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* 2002;29:637-647
55. Meyer, T. S.; Lamberts, B. L. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* 1965;107:144-145
56. Miura, K.; Furumoto, T. Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14:5312-5337
57. Mrízová, K.; Holasková, E.; Öz, M. T.; Jiskrová, E.; Frébort, I.; Galuszka, P. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances* 2013;32:137-157
58. Nahar, K.; Biswas, J. K.; Shamsuzzaman, A. M. M.; Hasanuzzaman, M.; Barman, H. N. Screening of indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes against low temperature stress. *Botany Research International* 2009;2:295-303

59. Nakagami, H.; Pitzschke, A.; Hirt, H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 2005;10:339-346
60. Nakano, K.; Tamura, S.; Otuka, K.; Niizeki, N.; Shigemura, M.; Shimizu, C.; Matsuno, K.; Kobayashi, S.; Moriyama, T. Development of a highly sensitive three-dimensional gel electrophoresis method for characterization of monoclonal protein heterogeneity. *Analytical Biochemistry* 2013;438:117-123
61. Nishi, T.; Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature’s most versatile proton pumps. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2002;3:94-103
62. Nishiyama, I. Climate influence on pollen formation and fertilization. In: Tsunoda, S.; Takahashi, N. *Biology of Rice*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; Tokyo: Japan Scientific Societies Press. 1984:153-171 ISBN: 4-7622-7396-1
63. Oh, S. J.; Kwon, C. W.; Choi, D. W.; Song, S. I.; Kim, J. K. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 2007;5:646-656
64. Örvar, B. L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R. S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 2000;23:785-794
65. Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics* 2003;33:311-323
66. Patterson, A. H.; Bowers, J. E.; Bruggmann, R.; Dubchak, I.; Grimwood, J.; Gundlach, H.; Haberer, G.; Hellsten, U.; Mitros, T.; Poliakov, A.; Schmutz, J.; Spannagl, M.; Tang, H.; Wang, X.; Wicker, T.; Bharti, A. K.; Chapman, J.; Feltus, F. A.; Gowik, U.; Grigoriev, I. V.; Lyons, E.; Maher, C. A.; Martis, M.; Narechania, A.; Otiillar, R. P.; Penning, B. W.; Salamov, A. A.; Wang, Y.; Zhang, L.; Carpita, N. C.; Freeling, M.; Gingle, A. R.; Hash, C. T.; Keller, B.; Klein, P.; Kresovich, S.; McCann, M. C.; Ming, R.; Peterson, D. G.; Mehboob-ur-Rahman; Ware, D.; Westhoff, P.; Mayer, K. F.; Messing, j.; Rokhsar, D. S. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 2009;457:551-556
67. Pearce, R. S. Plant freezing and damage. *Annals of Botany* 2001;87:417-424
68. Pinheiro, C. et Chaves, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* 2011;62:869-882
69. Polaskova, V.; Kapur, A.; Khan, A.; Molloy, M. P.; Baker, M. S. High-abundance protein depletion: Comparison of methods for human plasma biomarker discovery. *Electrophoresis* 2010;31:471-482

70. Qureshi, M. I.; Qadir, S.; Zolla, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* 2007;164:1239-1260
71. Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002;2:3-10
72. Rabilloud, T.; Chevallet, M.; Luche, S.; Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics* 2010;73:2064-2077
73. Rabilloud, T.; Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* 2011;74:1829-1841
74. Rodriguez, M. C.; Petersen, M.; Mundy, J. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 2010; 61:621-649
75. Rorat, T. Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2006;11:536-556
76. Satake, T. Sterile-type cold injury in paddy rice plants. In: International Rice Research Institute. *Climate and Rice*. Los Banos: Proceedings of the Symposium on Climate and Rice. 1976:281-300
77. Sato, Y.; Murakami, T.; Funatsuki, H.; Matsuba, S.; Saruyama, H.; Tanida, M. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany* 2000;52:145-151
78. Shibasaki, K.; Uemura, M.; Tsurumi, S.; Rahman, A. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 2009;21:3823-3838
79. Smékalová, V.; Doskočilová, A.; Komis, G.; Šamaj, J. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 2014;32:2-11
80. Soderlund, C.; Descour, A.; Kudrna, D.; Bomhoff, M.; Boyd, L.; Currie, J.; Angelova, A.; Collura, K.; Wissotski, M.; Ashley, E.; Morrow, D.; Fernandes, J.; Walbot, V.; Yu, Y. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLOS Genetics* 2009;5
81. Soltész, A.; Vágújfalvi, A.; Rizza, F.; Kerepesi, I.; Galiba, G.; Cattivelli, L.; Coraggio, I.; Crosatti, C. The rice *Osmyb4* gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants. *Journal of Applied Genetics* 2012;53:133-143
82. Šamaj, J. et Thelen, J. J. Plant Proteomics: *Plant proteome response to abiotic stress*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007:346 ISBN: 13 978-3-540-72616-6

83. Špunar, J.; Vaculová, K.; Špunarová, M.; Nesvadba, Z. Comparison of important parameters of spring and winter barley cultivated in sugar beet production area of Czech Republic. *Rostlinná Výroba* 2002;48:237-242
84. Takáč, T. The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. *Plant Soil and Environment* 2004;50:27-32
85. Tattersall, E. A.; Grimplet, J.; DeLuc, L.; Wheatley, M. D.; Vincent, D.; Osborne, C.; Ergül, A.; Lomen, E.; Blank, R. R.; Schlauch, K. A.; Cushman, J. C.; Cramer, G. R. Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Functional & Integrative Genomics* 2007;7:317-333
86. The International Barley Genome Sequencing Consortium. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 2012;491:711-716
87. Thomashow, M. F. Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiology* 1998;118:1-8
88. Thomashow, M. F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* 2001;125:89-93
89. Tuteja, N. et Sopory, S. K. Plant signaling in stress. *Plant Signaling & Behavior* 2008;3:79-86
90. Van Zee, K.; Chen, F. Q.; Hayes, P. M.; Close, T. J.; Chen, T. Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley. *Plant Physiology* 1995;108:1233-1239
91. Ventzki, R.; Rüggeberg, S.; Leicht, S.; Franz, T.; Stegemann, J. Comparative 2-DE protein analysis in a 3-D geometry gel. *BioTechniques* 2007;42:271-279
92. Vítámvás, P.; Kosová, K.; Prášil, I. T. Proteome analysis in plant stress research. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 2007;43:1-6
93. Wen, J. Q.; Oono, K.; Imai, R. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiology* 2002;129:1880-1891
94. Xue, G. P. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research* 2002;30:e77
95. Xue, G. P. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *The Plant Journal* 2003;33:373-383

96. Yadav, S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development* 2009;30:515-527
97. Yamada, S.; Kotake, Y.; Demizu, Y.; Kurihara, M.; Sekina, Y.; Kanda, Y. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Scientific Reports* 2014;4:5952
98. Zhang, M.; Lv, D.; Ge, P.; Bian, Y.; Chen, G.; Zhu, G.; Li, X.; Yan, Y. Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Proteomics* 2014;109:290-308
99. Zhu, J.; Zhang, K.-X.; Wang, W.-S.; Gong, W.; Liu W.-C.; Chen, H.-G.; Xu, H.-H.; Lu, Y.-T. Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via *ARR1/12*. *Plant Cell Physiology* 2015;56:727-736

9. Seznam použitých zkratek

2-DE	dvourozměrná elektroforéza
AAA ATPáza	adenosintrifosfát syntáza asociovaná s různými buněčnými aktivitami
ABA	kyselina abscisová
APS	peroxodisíran amonný
CBF/DREB	vázající se na dehydrataci respondující elementy v DNA
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
<i>COR</i>	chladem regulované geny
cv	odrůda
DHN5	dehydrin 5
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
<i>ERD</i>	geny vyvolané brzkou dehydratací
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HvCBF	protein vázající se na dehydrataci respondující elementy v DNA z <i>Hordeum vulgare</i>
HvMPK	mitogen-aktivovaná protein kináza z <i>Hordeum vulgare</i>
IAA	amid kyseliny jodoctové
ICE	induktory exprese CBF
IPG	imobilizovaný pH gradient
<i>KIN</i>	chladem vyvolané geny
<i>LTI</i>	geny vyvolané nízkou teplotou
MAPK	mitogen-aktivovaná protein kináza
MAP2K, MAPKK, MKK, MEK	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza
MAP3K, MAPKKK, MEKK	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza kináza
Mr	molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>OsAOX1</i>	gen kódující alternativní oxidázu z <i>Oryza sativa</i>
Osmyb4	myeloblastomový protein z <i>Oryza sativa</i>

pI	izoelektrický bod
PPR	pentatricopeptid opakování
PsbO	fotosystém II mangan-stabilizující protein
<i>RD</i>	geny reagující na vysychání
RNS	reaktivní částice dusíku
ROS	reaktivní částice kyslíku
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxidáza
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
SNF-1	sacharózu nefermentující protein kináza
SnRK2	SNF-1 příbuzné protein kinázy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin