

---

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra genetiky a šlechtění**



**Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene  
pomocí současných metod proteomiky**

Disertační práce

**Doktorand:** Ing. Zbyněk Škodáček  
**Školitel:** doc. Dr. Ing. Pavel Vejl  
**Školitel specialista:** RNDr. Ilja Tom Prášil, CSc

2013

---

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky** vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne 17. července 2013

Zbyněk Škodáček

---

Rád bych tuto práci věnoval svým rodičům za jejich nezastupitelné místo v mém životě a za jejich nezměrnou podporu, a to samozřejmě nejen v době, kdy tato práce vznikala.

Moje srdečné díky patří také kolegům z Laboratoře proteomiky Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni, v čele s Dr. Iljou Tomem Prášilem, Dr. Pavlem Vítámvásem, Dr. Klárou Kosovou a Ing. Milanem Oldřichem Urbanem a doc. Pavlovi Vejlovi, kterým děkuji za to, že mi umožnili nahlédnout do nesmírně zajímavého světa proteinů a proteomiky.

Dále děkuji svým přátelům Luce a Radkovi, kterým, řekl bych, se značně ulevilo, když za tuto práci dokončil.

---

## OBSAH

Obsah.....	4
Seznam zkratk a symbolů .....	7
1 Úvod.....	3
1.1 Rostliny a voda .....	4
1.2 Morfogeneze rostlin jako důsledek sucha .....	6
1.3 Sucho a jeho definovatelnost .....	7
1.4 Proteomické kompendium.....	10
1.5 Proteosyntéza proteinů .....	12
1.5.1 Iniclace translace .....	13
1.5.2 Elongace proteinového řetězce.....	16
1.5.3 Terminace translace.....	17
1.6 Biosyntéza proteinů v chloroplastech jako specifikum rostlin.....	17
1.7 Degradace proteinů a odpověď rostliny na stresy .....	18
1.8 Modifikace a sbalování proteinů .....	21
1.8.1 Proteolýza jako modifikace bílkovin.....	21
1.8.2 Svinování proteinů .....	21
1.8.3 Chaperony .....	22
1.8.4 Chaperoniny .....	23
1.9 Transport proteinů .....	25
1.10 Suchovzdornost rostlin a její determinace .....	26
1.11 Proteiny indukované suchem .....	27
1.11.1 Signální dráhy zapojené při expresi suchem indukovaných proteinů .....	27
1.11.2 LEA proteiny a dehydriny .....	33
1.11.3 Dehydriny – jejich topochemie .....	33
1.11.4 Dehydriny – jejich morfologie a klasifikace .....	35
1.11.5 Dehydriny ječmene .....	37
1.11.6 Aquaporiny.....	40
1.11.7 Kyselina abscisová .....	41
1.11.8 Oxidativní stres a s ním asociované transdukční signální dráhy.....	43
1.11.9 Osmotické přizpůsobení.....	45
1.12 Diferenční neboli srovnávací proteomika.....	47
1.12.1 Metoda elektroforetické separace proteinů .....	48
1.12.2 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza.....	49
1.13 Principy hmotnostní spektrometrie v proteomice .....	52
1.13.1 Sekvenování peptidů hmotnostní spektrometrií.....	54
1.14 Diskriminace izotopu <sup>13</sup> C.....	55

---

1.14.1	Šlechtění rostlin na vyšší účinnost využití vody .....	56
2	Hypotézy disertační práce .....	60
3	Cíle disertační práce .....	61
4	Materiál a metody.....	62
4.1	Organizace pokusů .....	62
4.2	Biologický materiál .....	63
4.3	Stanovované charakteristiky.....	64
4.3.1	Definice charakteristik .....	64
4.3.2	Stanovení charakteristik .....	65
4.4	Optimalizace extrakce frakce bohaté na dehydriny.....	67
4.4.1	Metoda extrakce frakce bohaté na dehydriny podle Vítámvás <i>et al.</i> (2007).....	67
4.4.2	Metoda extrakce frakce bohaté na dehydriny podle Sun <i>et al.</i> (2009).....	68
4.4.3	Modifikace metody izolace frakce bohaté na dehydriny podle Sun <i>et al.</i> (2009).. .....	69
4.5	Elektroforetické dělení proteinů .....	69
4.5.1	Příprava gelů .....	69
4.5.2	Příprava a nanášení vzorků .....	70
4.5.3	Elektroforetická separace vzorků .....	71
4.5.4	Přenos proteinů z gelu na membránu .....	71
4.5.5	Hybridizace membrány s protilátkami a vizualizace dehydrinů .....	71
4.6	Metodický postup extrakce totálních proteinů .....	72
4.6.1	Rozpuštění totálních proteinů v lyzačním pufru .....	73
4.6.2	Úprava pH .....	73
4.6.3	Stanovení koncentrace proteinů .....	73
4.6.4	Rekonstituce barviček Cy5Dye <sup>TM</sup> .....	74
4.6.5	STOP barvení .....	74
4.6.6	Rehydratace IPG stripů s imobilizovaným pH gradientem.....	75
4.6.7	Izoelektrická fokusace.....	75
4.6.8	Příprava 12,5% akrylamidových gelů .....	75
4.6.9	Ekvilibrace IPG stripů – redukce a alkylace thiolových skupin .....	76
4.6.10	Příprava elektroforetické cely .....	76
4.6.11	Elektroforetická separace .....	76
4.7	Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty .....	77
4.8	Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání.....	78
4.9	Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení půdy vodou a náhlého vysychání .....	79
4.10	Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu .....	80
4.11	Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha .....	81

---

5	Výsledky.....	82
5.1	Optimalizace izolace frakce bohaté na dehydriny.....	82
5.2	Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty .....	83
5.2.1	Faktorová analýza .....	88
5.3	Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení půdy vodou a náhlého vysychání.....	94
5.3.1	Faktorová analýza – I. odběr .....	104
5.3.2	Faktorová analýza – II. odběr.....	107
5.4	Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání.....	109
5.4.1	Faktorová analýza .....	112
5.5	Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu.....	115
5.5.1	Dehydrinové a fyziologické analýzy.....	115
5.5.2	Faktorová analýza .....	120
5.5.3	Diferenční gelová elektroforéza – 2-D-DIGE.....	123
5.6	Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha.....	136
6	Diskuse výsledků.....	141
6.1	Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty ....	142
6.2	Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – I. odběr.....	144
6.3	Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – II. odběr .....	145
6.4	Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání.....	146
6.5	Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu.....	147
6.6	Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha.....	149
7	Závěr.....	150
8	Využitelnost poznatků proteomiky ve šlechtění rostlin .....	154
9	Publikace doktoranda .....	157
10	Použitá literatura .....	160
11	Přílohy .....	180
11.1	Příloha č. 1 .....	180
11.2	Příloha č. 2 .....	183
11.3	Příloha č. 3 .....	185
11.4	Příloha č. 4 .....	187

---

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A – adenin  
Å – angstrom  
ABRE – ABA Responsive Elements  
ABRE CE – ABRE Coupling Elements  
A místo na ribozomu – aminoacyl-tRNA vázající místo  
ANOVA – analýza rozptylu  
AP MALDI – MALDI provedená za atmosférického tlaku  
APS – persíran amonný  
APX – askorbát peroxidasa  
AREBs/ABFs – ABRE binding factor  
aa-tRNA – aminoacyl t-RNA  
ABA – kyselina abscisová  
AMK – aminokyselina  
AMP – adenosinmonofosfát  
AQPs – aqaporiny  
ATP – adenosintrifosfát  
BADH – betain aldehyd dehydrogenasa  
BrCN - bromkyan  
bZIP – Basic Leucine Zipper  
C – cytosin  
 $c_a$  – koncentrace CO<sub>2</sub> ve vnější atmosféře  
Ca<sup>2+</sup> – vápenatý kation  
cADP-Rib – cyklická adenosindifosfát ribosa  
CAT – katalasa  
CBF – C-repeat Binding Factor  
CBF/DREB – CRT-Binding Factor/DRE-Binding Factor  
cDNA – komplementární DNA  
 $c_i$  – intracelulární koncentrace CO<sub>2</sub> v listu  
C konec – konec proteinu s volnou karboxylovou skupinou  
CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý  
COM – cholin monoxygenasa  
COR – Cold-regulated Genes  
cpDNA – chloroplastová DNA  
CRT – C-repeat Regulatory Element  
*Dhn* – dehydrinové geny  
DHNs – dehydrinové proteiny  
DHN5 – dehydrinový protein 5  
DMF – dimethylformamid  
DNA – kyselina deoxyribonukleová  
DRE – Dehydration Responsive Element  
DTT – dithiotreitol  
eIFs – eukaryotické iniciační faktory  
eRF – uvolňovací faktory  
ESI – Electrospray Ionization  
E místo na ribozomu – exitové/eluční místo  
ESA – European Society Agronomy  
EST – Expressed Sequence Tags  
ex S – extra suchá varianta  
G – guanin

---

GADPH – glyceralddehyd-3-fosfát-dehydrogenasa  
GB – glycin betain  
GEO – Genetically Engineered Organism  
Glu – kyselina glutamová  
GMO – Genetically Modified Organism  
GSA – glutamát- $\gamma$ -semialdehyd  
GTP - guanosintrifosfát  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíku  
sHSP – Small Heat Shock Proteins  
IAA – jodacetamid  
IEF – izoelektrická fokusace  
IPG – imobilizovaný pH gradient  
IP<sub>3</sub> – inositol-1,4,5 trifosfát  
IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometer  
JIP-23 – jasmonátem indukovaný protein  
K – kontrolní varianta  
LC – kapalinová chromatografie  
LEA proteins – Late Embryogenesis Abundant Proteins  
LMO – Living modified organism  
LPO – Listina doporučených odrůd  
LSU – velká podjednotka Rubisca  
LTRE – Low Temperature Responsive Element  
Da – dalton  
A – ampér  
MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization  
MALDI-TOF – MALDI Time of Flight  
MALDI TOF/TOF – MALDI Time of Flight/Time of Flight  
MAPK – Mitogen-activated Protein Kinase  
MAPKK – Mitogen-activated Protein Kinase Kinase  
MAPKKK – Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase  
MAS – markery asistovaná selekce  
MDA - malondialdehyd  
MDAR – monodehydroaskorbátredukasa  
Mg<sup>2+</sup> – hořčnatý kation  
MIP – Major Intrinsic Protein  
mRNA – mediátorová RNA  
Met-tRNA – tRNA methionin  
Mr – relativní molekulová hmotnost  
MS – hmotnostní spektrometrie  
M – mol  
mtDNA – mitochondriální DNA  
MW – molekulová hmotnost  
MYB – transkripční faktor myeloblastosis  
MYBR – regulační element promotoru myeloblastosis  
MYC – transkripční faktor myelocytomatosis  
MYCR – regulační element promotoru myelocytomatosis  
NAC – alternativní komplex asociovaný se syntetizujícím se řetězcem  
NAADP – Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate  
NCED – 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenasa  
NDPKs – nukleosiddifosfát kinasa



---

N konec – konec proteinu s volnou aminoskupinou  
NTP – nukleosidtrifosfát  
OEC – Oxygen Evolving Complex  
OP – osmotický potenciál  
Pa – pascal  
PDSI – Palmer Drought Severity Index  
PGK – fosfoglycerátkinasa  
P místo na ribozomu – peptidyl-tRNA vázající místo  
P5C –  $\Delta$ 1-pyrrolin-5-karboxylát  
P5CDH – P5 dehydrogenasa  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PEST – sekvence složená z kyselin prolinu, kys. glutamové, serinu a threoninu  
pI – izoelektrický bod  
PIP – Plasma Membrane Intrinsic Protein  
PLC – fosfolipasa C  
PMF – Peptide Mass Fingerprinting  
POD – peroxidasa  
Pro – prolin  
ProDH – prolin dehydrogenasa  
PVK – půdní vodní kapacita  
QTL – Quantitative Trait Loci  
RAB proteins – Responsive to Abscisic Acid Proteins  
RAI – Rain Anomaly Index  
REC – relativní elektrická vodivost  
RNA – kyselina ribonukleová  
rRNA – ribozomální RNA  
ROS – Reactive Oxygen Species  
RP – rehydratační pufr  
Rubisco – ribuloza-1,5bisfosfát karboxylasa/oxygenasa  
S – jednotka sedimentačního koeficientu Svedberg  
S – suchá varianta  
SDS – dodecyl sulfát sodný  
SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SDO – Seznam doporučených odrůd  
SH – thiolová skupina  
SOD – superoxid dismutasa  
SIMR – Stress Induced Morphogenic Response  
SRP – částice rozpoznávající signál  
SSU – malá podjednotka Rubisca  
T – thymin  
TBS – TRIS Buffer Solution  
TEMED – NNN'N'tetrametylendiamin  
TIPs – Tonoplast Intrinsic Proteins  
TPP – T-6-P fosfatasa  
TPS – 6-fosfát (T-6-P) syntasa  
TPSP – bigunkční fúzovaný enzym TPP a TPS  
TRIS – tris(hydroxymethyl) aminomethan  
tRNA – transferová RNA  
TTBS – TRIS Tween Buffer Solution  
UAA – stop kodon ochre

---

UAE – ubikvitin aktivační enzym  
UAG – stop kodon amber  
UCE – ubikvitin konjugační enzym  
UGA – stop kodon opal  
ULE – ubikvitin ligasa  
V – volt  
VSD – vodní sytostní deficit  
VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby  
W – watt  
WCOR – Wheat Cold Regulated Proteins  
WSI – Water Satisfaction Index  
WT – Wild Type  
WUE – Water Use Efficiency; efektivita využití vody  
 $\psi\pi$  – osmotický potenciál  
 $^{13}\text{C}$  – těžký izotop uhlíku  
 $\Delta^{13}\text{C}$  – izotopová diskriminace  $^{13}\text{C}$   
 $\delta^{13}\text{C}$  – izotopové složení látky  
1-D SDS PAGE – jednorozměrná SDS gelová elektroforéza  
2-D SDS PAGE – dvourozměrná SDS gelová elektroforéza  
2-D DIGE – dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza

## 1 ÚVOD

Celovegetační sucho, střídavé sucho a sucho doprovázené nízkou a vysokou teplotou je v přírodě a v zemědělství nejdůležitější faktor limitující rozšíření druhů a výkonnost rostlin. Rostoucí lidská populace začíná pociťovat nedostatek pitné a užitkové vody a vody pro průmyslové potřeby. Zásoby povrchové a podzemní vody se zmenšují. Odhaduje se, že asi 80 % vody, která je pro tyto účely potenciálně dostupná se spotřebuje na zavlažování zemědělských plodin, jejichž produkce musí v budoucnu růst spolu s rostoucí početností lidstva (Morison *et al.*, 2009) V současné době je ve světě více jak 40 % potravin produkováno ze zavlažovaných ploch. Z kongresů ESA (European Society Agronomy) v Bologni v roce 2008 a v Montpellieru pořádaného v roce 2010 vyplynulo, že v Evropské unii je v oblasti Středozemního moře více jak 70 % vodních zdrojů využito pro závlahy a požadavky dále porostou, protože trend vývoje počasí v této oblasti je alarmující. Je to postupný konstantní růst průměrných teplot a postupný pokles průměrných srážek v průběhu posledních několika desítek let. V centrálním Španělsku vzniká poušť. V jižní Evropě od Řecka po Portugalsko je patrný pokles podzemní vody, ubývá srážek a ty jsou navíc nerovnoměrně rozdělené, průměrná teplota v době vegetace stoupá, množství srážek klesá (Bláha, 2011).

Na řadě území České republiky dochází k poklesu hladiny spodní vody, na mnohých místech se spotřebuje více vody, nežli se obnoví z přirozených zdrojů (Bláha *et Hnilička* 2008). V České republice jsou zemědělství a sektor vodního hospodářství v současné době velmi náchylné k suchu. Podle práce Potop *et al.* (2009) je území České republiky 28 % času v mírném stresu suchem, 14,2 % času ve středním stresu suchem, 10,4 % času ve vážném suchu a 4,8 % času v extra suchu.

Vodní deficit je jedním z nejdůležitějších faktorů, které limitují růst a následně vývoj rostlin ve spojitosti s jejich produktivitou (Maltrasi *et al.*, 2002), přičemž existuje celosvětová snaha šlechtit odrůdy kulturních rostlin tolerantních k působení abiotických stresů jako je sucho, chlad, vysoké teploty, nutriční nedostatky a salinita (Gaspar *et al.*, 2002). Odrůdy kulturních rostlin se v mnoha případech výrazně liší svojí adaptabilitou. Adaptabilitu je možné charakterizovat jako schopnost určitého genotypu pozitivně reagovat na měnící se agroekologické podmínky (Chloupek *et Hrstková*, 2005). Po vystavení rostlin stresovým podmínkám u nich dochází k indukci celé řady biochemických a fyziologických změn, které směřují k vytvoření ochranných mechanismů zaměřených na účinné využívání dostupné

vody, přičemž nejodolnější genotypy bývají ty, které vykazují toleranci na více úrovních současně.

Adaptační mechanismy zvyšující odolnost rostlin vůči stresovým podmínkám vyvolaných suchem jsou založeny na různých morfologicko-fyziologicko-biochemických vlastnostech a faktorech jako jsou velikost kořenového systému, tloušťka kutikuly nebo velikost průduchů, které se odráží na molekulární úrovni v různé expresi stresových genů. Odpověď rostlin vůči stresu je regulována větším počtem signálních drah, které aktivují transkripci a translaci genů. Rostliny obsahují velké množství transkripčních faktorů, které lze definovat jako jakékoli proteiny, které mají schopnost spouštět či jinak regulovat transkripci DNA, a tím následně ovlivňovat expresi genů. Kupříkladu genom *Arabidopsis* kóduje více než 1 500 transkripčních faktorů (Riechmann *et al.*, 2000).

### **1.1 Rostliny a voda**

Problematika vody je současné době jedním z nejdiskutovanějších témat jak na poli vědeckém, společenském tak i politickém. V podstatě nejde ani tak o celkové zásoby vody, které jsou na naší planetě prakticky nevyčerpatelné, ale hlavně o distribuci vody v jednotlivých oblastech zemského povrchu a v rámci vegetačního období jednotlivých druhů rostlin, rostlinných populací, fytoocenóz a ekosystémů. Světová spotřeba vody se každých 20 let zdvojnásobuje, což je víc jak dvojnásobek v porovnání s růstem lidské populace. Nové zdroje vody jsou z hlediska jejího čištění stále vzácnější a dražší. Nelze se proto divit, že se v současné době voda považuje za modré zlato (blue gold) (Barlow *et Clarke*, 2002).

Tendence klimatických změn za posledních sto let signalizuje stálý pokles sumy ročních atmosférických srážek a pokles ročních průměrů relativní vlhkosti vzduchu. Současně se zvyšují průměrné roční teploty vzduchu, čímž narůstají evaporační požadavky rostlin na vodu. Období sucha mezi atmosférickými srážkami se prodlužují, takže rostliny jsou často vystaveny vodnímu deficitu. Takové nepříznivé klimatické podmínky prostředí se následně projevují ve snížení rychlosti růstu i nižší produkci. Na postupné prodlužování období sucha, při postupném poklesu zásoby využitelné půdní vody k bodu vadnutí, rostliny většinou reagují narušením poměru fotosyntézy a respirace, poklesem tvorby biomasy, poklesem turgoru, vadnutím až odumíráním. Sucho jako přírodní fenomén se svými důsledky řadí mezi přírodní katastrofy. Podle údajů Evropské komise se za posledních 30 let zvýšila průměrná plocha území EU postihnutých suchem ze 6 % na 18 %, za což ekonomika EU zaplatila 100 miliard EUR (Čimo *et al.*, 2008).

Neexistuje životní proces, který by suchem nebyl postihnutý. Vzhledem k tomu, že u homoiohydričských rostlin se vodní deficit vyvíjí postupně, jednotlivé funkce jsou postiženy v určité relativně ustálené sekvenci. Prvotní odpovědí rostlin na vodní deficit je pokles turgoru a zpomalení prodlužovacího růstu. Velmi záhy nastupují poruchy proteinového metabolismu, čímž klesá mitotická aktivita, přičemž S fáze je postižená nejvíce. Dalším prohlubováním vodního deficitu je spuštěna syntéza kyseliny abscisové, která jako zprostředkovatel informace o stresu indukuje zavírání průduchů, mění schéma alokace asimilátů (upřednostňuje růst kořenů) a urychluje reprodukční proces (Larcher, 2003).

Všeobecně rostliny reagují na dlouhodobý vodní stres vícero aklimatizačními a adaptačními mechanismy (Brestič *et* Olšovská, 2001), jako jsou omezení růstu a velikost listové plochy, zavírání průduchů a následné snížení jejich vodivosti, osmotické přizpůsobení buněk pletiv, stimulace stárnutí a opad listů, změna disipace tepelné energie a energie záření z listů, vytváření silnější vrstvy vosku na povrchu listů, zvýšení transpiračního odporu, rychlejší růst kořenů do větších hloubek půdy, vytváření kompenzačních kořenů, změna poměru hmotnosti nadzemní a podzemní části rostliny, zvýšená produkce různých chemických látek (Slováková *et* Mistrík, 2007).

Reakce rostlin na nedostatek vody v prostředí do značné míry závisí na evolučně daném způsobu hospodaření s vodou. V této souvislosti rozlišuje Ferus (2011) dvě strategie:

1. homoiohydrismus, který charakterizuje snahu rostliny udržet vysoký vodní potenciál pletiv i po dobu sucha (výraz není chápán doslova, neboť rostliny se stabilním obsahem vody neexistují),
2. poikilohydrismus definovaný jako neschopnost kontrolovat ztrátu vody do okolního prostředí.

Všechny druhy, se kterými se setkáváme v zemědělství, patří do první skupiny. Prostřednictvím různých mechanismů se snaží minimalizovat výkyvy obsahu vody ve svých pletivech a zabezpečit relativně stabilní vodní bilanci. Masarovičová *et al.* (2011) v této souvislosti uvádí, že v přirozených podmínkách se na úrovni porostu vyvinuli tři základní životní strategie, které rostlinám pomáhají přežít v nepříznivých podmínkách snížené zásoby vody v půdě. Jedná se o:

1. předcházení suchu (drought escape),
2. toleranci k suchu (drought tolerance),
3. vyhnutí se suchu (drought avoidance).

Redukce ztrát vody uvedenými mechanismy se dosahuje hlavně v nadzemních částech rostlin, které jsou v bezprostředním kontaktu s atmosférou. Reakce rostlin závisí na povaze nedostatku vody, na základě čehož je možné je rozdělit na:

1. fyziologické reakce na krátkodobé změny,
2. aklimatizaci na určitou hladinu dostupné vody,
3. adaptaci na sucho.

Krátkodobé změny na vodní stres se aktivují za několik sekund po vystavení rostlin stresu, primárně jsou vázané na průduchovou regulaci vodní páry, čímž se redukuje ztráta vody transpirací a maximalizuje se příjem CO<sub>2</sub>. Na rozdíl od aklimatizace (fenotypové, nikoli geneticky determinované odolnosti rostlin) v případě adaptace jde o dlouhodobou, geneticky fixovanou adaptaci rostlin na sucho (Slováková *et* Mistrík, 2007).

### **1.2 Morfogeneze rostlin jako důsledek sucha**

Při suchu klesá obsah vody v rostlině, protoplasty buněk se smršťují a jejich turgor se snižuje. Vzhledem k citlivosti prodlužovacího růstu na změnu vnitřního tlaku, krátce po začátku dehydratace se zastavuje expanze listů a prodlužování kořenů (Tiaz *et* Zeiger, 2002).

Menší listová plocha transpiruje méně vody a v půdě se uchovává zásoba vody na další období. Vodní stres však nelimituje jen velikost listů, ale i jejich počet, protože snižuje počet a rychlost růstu vrstev buněk růstového vrcholu. Inhibicí růstu se nahromaděné substráty stávají přístupné pro využití ve stresové ekonomice rostlin (Neumann, 2008). Stávají se materiálovou bází pro syntézu antioxidantů, jako jsou cukry, organické kyseliny, aminokyseliny a kvartérní amoniové báze (Morgan, 1984).

Na druhé straně, prodlužovací růst kořene je nízkým vodním potenciálem půdy limitovaný jen mírně, a v tzv. distální elongační zóně (2-3 mm od apexu) pokračuje bez změny, což se považuje za významnou adaptaci rostlin suchých stanovišť. Udržování růstu přitom působí spíše se změnou fyzikálně-chemických vlastností buněčných stěn, jak se stabilizací turgoru (Wu *et* Cosgrove, 2000).

Rozhodující úlohu ve zprostředkování informace o suchu a regulaci růstu nadzemní části rostliny na začátku působení stresu má kyselina abscisová, která stojí i za krátkodobou stimulací růstu hlavního kořeně (Davies *et* Bacon, 2003) a podle nedávných výsledků se také uplatňuje i při jeho větvení (Signora *et al.*, 2001). Uvolnění dormance laterálních kořenů zprostředkované ABA spustí antiklinální a asymetrické dělení buněk pericyklu, což směřuje k formování primordia, které se současnou aktivací apikálního meristému přerůstá vrstvami pokožkových buněk do půdy, kde dospívá.

V otázce kontroly morfogeneze vznikly tři paralelní myšlenkové proudy. První z nich zdůrazňuje, že morfogeneze je pod kontrolou gradientů signálních látek (morfogenů) na úrovni pletiva, orgánu a organismu. Tyto určují růstová specifika jednotlivých buněk. Environmentální stres zasahuje podle této teorie do distribuce morfogenů a způsobuje změny v regulaci jejich růstu (Prusinkiewicz *et* Rolland-Lagan, 2006). Alternativou k této škole je názor, že morfogeneze je výhradně buněčným procesem kontrolovaným rychlostí dělení anebo expanzí individuálních buněk (Lindsey *et* Topping, 1998). Beemster *et al.*, (2003) jsou zastánci integrované vize morfogeneze s kontrolou na buněčné úrovni jako i úrovni organismu.

Pokud se vodní deficit jako i další typy stresů vyvíjejí relativně pomalu a mají tedy chronický průběh, vykazují rostliny všeobecnou morfologickou reakci v podobě tzv. stresem vyvolané morfogenní odpovědi (SIMR – stress-induced morphogenic response). SIMR dle Feruse (2011) a Potterse *et al.* (2007) zahrnuje:

1. inhibici elongace buněk,
2. lokalizovanou stimulaci dělení buněk,
3. alternaci v diferenciačním stavu buněk.

V posledním období se věnuje zvýšená pozornost šlechtění na suchovzdornost a toleranci rostlin na sucho. Výběr genotypů s vyšším stupněm suchovzdornosti je nejčastěji založený na parametrech základních fyziologických procesů. Sledují se například rozdíly mezi genotypy v porovnání stupňů dehydratace při stejně dlouhém působení sucha. V důsledku akumulace a redistribuce kyseliny abscisové v listech, činnosti průduchů, efektivní osmoregulaci a udržování objemu buněčných kompartmentů, zůstává fotosyntéza relativně neporušená až do středních úrovní deficitu vody v listech. Při hodnocení suchovzdornosti genotypů se také využívá efektivnost využití vody (WUE) – viz další kapitoly. Velmi intenzivně se pracuje na využívání transgenních rostlin (GMO – genetically modified organism, LMO – living modified organism, GEO – genetically engineered organism).

### **1.3 Sucho a jeho definovatelnost**

Kožnarová *et* Klabzuba, 2010 uvádějí, že definovat pojem „sucho“ je úkol poměrně složitý navzdory obecné představě, že se jedná o pojem se zcela jednoznačným výkladem. V odborné literatuře se lze setkat s poměrně rozsáhlým a velmi různorodým souborem definic, které se snaží uvedený jev popsat. Jako příklad poslouží definice uvedené v Meteorologickém slovníku výkladovém a terminologickém: Sucho je velmi neurčitý, avšak v meteorologie často používaný pojem, znamenající v zásadě nedostatek vody v půdě, rostlinách nebo v

atmosféře. Jednotlivá kritéria pro kvantitativní vymezení neexistují s ohledem na rozmanitá hlediska meteorologická, hydrologická, zemědělská, bioklimatologická a celou řadu zaměřených na škody v různých oblastech národního hospodářství. Sucho meteorologické je nejčastěji definováno časovými a prostorovými srážkovými poměry, např. výskytem suchého a vyprahlého období. Kromě množství a intenzity srážek vztažených k srážkovému normálu pro dané místo a roční dobu, stanovili mnozí autoři různé definice v závislosti na dalších meteorologických prvcích, a to hlavně na výparu, teplotě vzduchu, rychlosti větru, vlhkosti vzduchu aj. Sucho agronomické vyjadřuje nedostatek vody v půdě ovlivněný předchozím nebo ještě nadále trvajícím výskytem meteorologického sucha. Z dalších vlivů mají značný význam vlastnosti půdy, úroveň zemědělské techniky a celá řada dalších faktorů. Definice je velmi obšírně diskutovaným problémem, který předpokládá podrobné znalosti z hydrobiologie, rostlinné fyziologie, zemědělské ekonomiky atd. Sucho nahodilé je nepravidelně se vyskytující období podnormálních srážek, trvající několik týdnů, měsíců i roků. Ve vegetačním období bývá srážkový deficit doprovázen často i nadnormálními teplotami, nižší poměrnou vlhkostí vzduchu, zmenšenou oblačností a větším počtem hodin slunečního svitu. Tyto meteorologické faktory mají pak za následek větší evapotranspiraci, čímž se nedostatek vody (vláhy) dále zvyšuje. Sucho nahodilé je velmi nebezpečné právě svým neočekávaným a nepravidelným výskytem. Ve střední Evropě vzniká v důsledku nadnormálně četného výskytu anticyklonálních typů povětrnostních situací, při nichž se nad evropskou pevninou často uplatňují blokující anticyklony. Také intenzita srážek vypadávajících při relativně menším počtu předcházejících atmosférických front je v oblastech anticyklon podstatně zeslabována. Příčiny těchto dlouhodobějších povětrnostních anomálií nebyly dosud uspokojivě objasněny, a proto je velice obtížné tato nahodilá sucha předpovídat.

Kvantitativní vymezení stupně abnormality daného sucha pomocí různých klimatologických indexů a jeho srovnání s předcházejícími případy se pravděpodobně nikdy objektivně nepodaří zajistit pro složitost vzájemného působení meteorologických, hydropedologických, agrotechnických a dalších faktorů. Navíc je z praxe známo, že „stejně“ sucho na počátku vegetace je mnohem škodlivější než výskyt téhož suchého období v pozdním létě. Efekt sucha není odvislý pouze od jeho průběhu, intensity, postižené oblasti a na druhé straně zásobenosti této oblasti vodou, ale také na stupni ekonomické rozvinutosti dané země. Z tohoto důvodu mohou být následky stejně intenzivního sucha různé v rozdílných regionech (Potop *et al.*, 2009).



Kvantitativní popis sucha jako agrometeorologického jevu je velice složité a při používání popisných charakteristik je nutno mít na paměti, že sucho je komplexní jev, u kterého se nedá v podstatě objektivně určit počátek ani jeho intenzita.

Rozhodujícím kritériem hodnocení nedostatku atmosférických srážek pro rozvoj určité rostliny nebo společenstva rostlin je zpravidla hranice sucha, které definovali různí autoři odlišně. Podle Pencka je to hranice mezi oblastí humidní a aridní. Lang ji určil podle Langova dešťového faktoru (průměrný úhrn srážek a roční teplota vzduchu), Georg pomocí rovnice vyjadřující roční úhrn srážek a průměrnou teplotou vzduchu. Podle hydrotermického koeficientu Seljaninova *HTK*, je to tehdy, když úhrn srážek je shodný s množstvím odpařené vody. Minář ji vymezil kladnou vláhovou jistotou, která charakterizuje vláhové poměry místa. Ukazatel sucha podle de Martona zahrnuje průměrný roční úhrn srážek v mm, průměrnou roční teplotu vzduchu, počet dní se srážkami v daném místě a průměrný počet srážkových dní v okolních lokalitách. Rovnici zlepšil Reichel do podoby vhodné pro střední Evropu, kde průměrný počet srážkových dnů ve střední Evropě je 180. Budyko navrhl použít index sucha určený z poměru celkové radiační bilance a množství tepla potřebného k vypaření srážek.

V roce 1968 vznikl Palmerův index suchosti (Palmer Drought Severity Index – PDSI), který je vhodný ke klasifikaci vodního režimu půdy, speciálně pro použití pro delší období jako rok nebo dlouhodobý průměr (nehodí se pro denní, někdy ani pro měsíční údaje). Je založen na hodnocení rozdílu mezi reálnými úhrny srážek a srážkami potřebnými pro evapotranspiraci a je vhodný k posuzování déletrvajících období sucha nebo deštivého počasí.

Poněkud odlišný index sucha – *Si* vychází z kombinace srážek, teploty vzduchu a vlhkosti půdy, kdy umožňuje charakterizovat zemědělské sucho nebo v jednodušším případě – bez půdní vlhkosti – meteorologické sucho. Podle Potop *et al.* (2009) v sobě tento index integruje výhody oproti PDSI indexu, neboť je jednodušší pro výpočet, neobsahuje konstanty a může být spočítán pro jakoukoli časovou periodu a místo, které nás zajímá. Nevýhodou je naopak jeho závislost na dostupnosti a kvalitě dlouhé řady dat vlhkosti půdy a nedostatečný počet pozorovacích stanic. *Si* index považuje Potop *et al.* (2009) za nejvhodnější index pro měření agronomického sucha v České republice, neboť v sobě zahrnuje nejen srážková data, ale také teplotní údaje a je proto vhodný pro determinaci suchých epizod. Tato práce dále uvádí, že dle modelu založeného na výpočtech indexu sucha *Si*, respektive jeho modifikaci *Si-m* (meteorologického či atmosférického sucha), lze z více než 45 % vysvětlit variabilitu výnosu obilnin při suchu. Výsledek vícenásobné regresní analýzy ukázal, že sucho bylo příčinou velké neúrody obilnin v České republice v letech 1964, 1976, 2000, 2002, 2003 a 2006.

Problematiku sucha lze řešit i pomocí indexů používaných pro hodnocení příliš vlhkých podmínek, resp. nadbytku srážek, kdy pojem „vláha“ (obdobně jako termín sucho) představuje v meteorologii neurčitý pojem, jímž se zpravidla rozumí vlhkostní poměry v půdě a někdy i spadlé atmosférické srážky. Ve vztahu k zemědělství se často hovoří o nadbytku nebo nedostatku vláhy, který má úzký vztah k závlahám a zavlažování (vláhový deficit, vláhové podmínky, vláhová bilance). V zemědělské meteorologii se zpravidla používá pojem produktivní vláha vyjadřující půdní vláhu využitelnou rostlinami. Také pro hodnocení vláhových poměrů se používá řada indexů. Například ukazatel zavlažení neboli koeficient zavlažení *K* vyjadřující bilanci půdní vody v měřitelných jednotkách. Tento ukazatel zavlažení (vypočtený za období od června do srpna) se používal v agroklimatické rajonizaci Československa zpracované v roce 1975 jako hlavní kritérium vláhových podmínek. Základem stanovení je potenciální výpar a úhrn srážek za určité období. Water Satisfaction Index – *WSI* definovali Frere a Popov speciálně pro studia zajištění minimální potřeby vody rostlinami pro dosažení určitého výnosu. Pro hodnocení potenciální zemědělské produkce jako vhodný mezičlánek mezi „suchem a přebytkem vody“ a „socioekonomickým dopadem“ doporučili Gomes a Petrasí Rain Anomaly Index – *RAI* (Kožnarová *et* Klabzuba, 2010).

### **1.4 Proteomické kompendium**

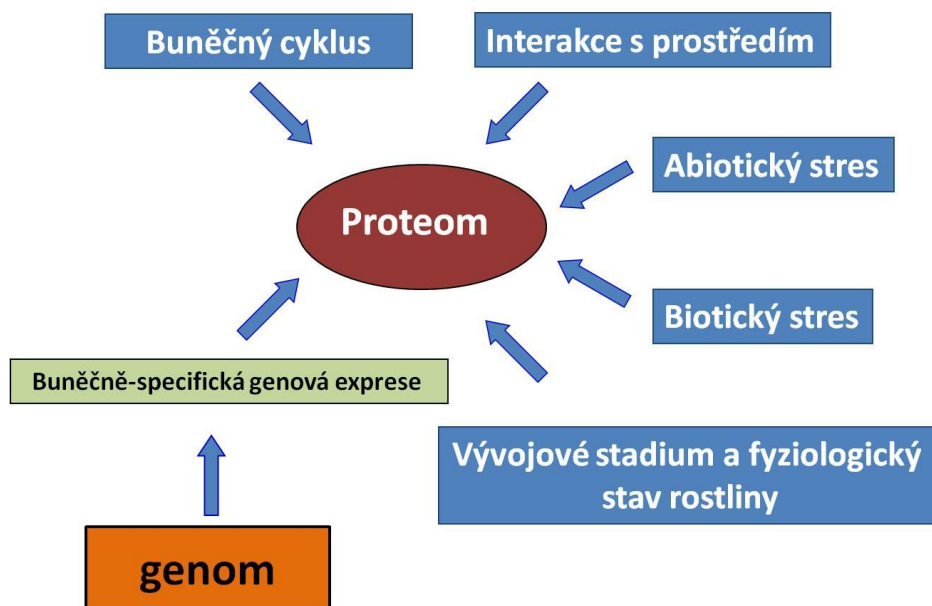
Slovo proteom (proteome; protein complement of the genome) použil poprvé australský doktorand Mark Wilkins v roce 1994 na konferenci v Sieně (Kovářová, 2005) k vyjádření proteinového ekvivalentu genomu (Collinsová *et* Jiráček, 2004). Proteomika se zabývá systematickou analýzou proteinů z hlediska jejich identity a množství (Chmelík, 2005) za jasně definovaných podmínek. Rozšíříme-li tuto definici, nejedná jen o identifikaci všech proteinů, ale i o objasnění jejich struktury, lokalizace, role a dynamiky v rámci buňky, tkáně a organismu.

Termín „genom“ je soubor genetické informace uložené v nukleových kyselinách konkrétního organismu a představuje relativně konstantní celek k zajištění buněčné dědičnosti a zároveň determinuje strukturu i funkční projevy buňky. Analogicky „proteom“ zahrnuje všechny bílkoviny (proteiny), které tvoří převažující součást buněčných struktur a vykonávají prakticky všechny buněčné funkce, tj. převádějí a zpracovávají biologickou informaci, uskutečňují výměnu látek a energie (metabolismus) (Kovářová, 2005). Můžeme tedy říci, že genetická informace je v organismu vyjádřena ve formě proteinů a jsou tedy skutečnými funkčními molekulami. Proteom je oproti genomu považován za velice dynamický celek, který odráží změny organismu a okolí. Proteiny jsou tedy stále pozměňovány.

Proteom je výrazně větší a složitější než genom, což souvisí s tím, že expresí určitého počtu genů vzniká daleko větší množství proteinů. Z desítek tisíce genů mohou vzniknout stovky tisíc proteinů a to hlavně díky alternativnímu sestřihu mRNA, preferenční a alternativní translaci, posttranslačním modifikacím (např. fosforylace, glykosylace, sulfonace, ubiquitinace, aj.) a nejrůznějším interakcím proteinů spojujících se do větších molekulárních celků. Pro zajištění aktivity a funkce proteinů jsou důležité nejen jejich modifikace, ale i jejich lokalizace v rámci buňky. Navíc se proteom v určitém časovém okamžiku (tj. proteom v užším slova smyslu) výrazně liší v různých částech rostlin, v různých fázích vývoje a za různých podmínek prostředí. Proteom tak odráží aktuální metabolický stav dané části rostliny a tím umožňuje lépe zkoumat konkrétní mechanismy odpovědné za přežití a rezistenci rostlin vůči stresům (Vítámvás *et al.*, 2007) a hlouběji tak proniknout do podstaty fungování živých organismů. Proteomika se zaměřuje na genové produkty, a proto mohou být zjištěny i modifikace proteinů, které nejsou zřejmé ze sekvence nukleotidů DNA (isoformy, posttranslační modifikace atd.) (Collinsová *et Jiráček*, 2004). Navíc mezi hladinou DNA, mRNA a proteinů zpravidla není vzájemná korelace, což ukazuje na specifickou proteomu jako důležitého mezičlánku mezi genomem a fenotypovým projevem (znakem). Proteom představuje klíčové propojení mezi transkriptomem a metabolomem. Společně tak tyto přístupy funkční genomiky rostlin umožňují detailní a zároveň komplexní pohled na biochemické procesy, neboť poskytují informace o aktuálních proteinech s enzymatickou, regulační a strukturní funkcí, které mají zásadní roli v metabolismu rostlin při adaptaci na měnící se podmínky prostředí.

Studium odezvy rostlin na stres na proteinové úrovni je důležité v řadě ohledů – proteiny jsou hlavními efektory řady fyziologických procesů v buňce, mají rozhodující vliv jak na složení metabolomu (proteinové enzymy jako katalyzátory metabolických procesů), tak i jakožto složky transkripčního a translačního aparátu (transkripční faktory, součást spliceosomů – sestřihového aparátu regulujícího tvorbu zralých mRNA, součást ribosomů a translačního aparátu regulujícího proteosyntézu) mají zásadní vliv na složení transkriptomu i proteomu samotného (Kosová *et al.*, 2011a).

Obrázek č. 1: Faktory ovlivňující proteom



Typická rostlinná buňka obsahuje od 5 tis. do 10 tis. různých polypeptidových sekvencí a miliardy individuálních proteinových molekul. Jestliže má taková buňka pracovat a fungovat, musí tyto proteiny správně syntetizovat, sbalovat, lokalizovat do metabolických kompartmentů, cytoplasmatických struktur a membránových systémů a v neposlední řadě je také degradovat.

### 1.5 Proteosyntéza proteinů

Proteiny představují velkou část obsahu rostlinných buněk a odpovídají za rozličné buněčné funkce. Není proto překvapující, že syntéza proteinů tzv. proteosyntéza, čili translace, má centrální postavení v tak významných fyziologicko-biochemicko-genetických procesech jako je buněčný růst, diferenciací či reprodukce. Syntéze proteinů předchází transkripce neboli přepis nukleotidové sekvence nesené vláknem DNA do polynukleotidového řetězce mediátorové RNA, známé jako mRNA (messenger RNA). Translace představuje mechanismus, kterým specializované riboproteinové komplexy „čtou“ informace obsažené v sekvenci mRNA a překládají je do korespondující sekvence aminokyselin, které jsou mezi sebou spojeny peptidovou vazbou. Celá řada proteinů musí být dále sestavena do vyšších supramolekulárních komplexů, které se nazývají kvartérní struktury (fotosyntetické komplexy představují právě takové multisubjednotkové struktury). Aby buňka správně fungovala, musí regulovat syntézu bílkovin na jedné straně a jejich odbourávání na straně druhé, to vše na základě vnitřních či vnějších signálů regulovaných řadou specifických proteinů.

Proteiny se v rostlinách syntetizují ve třech subcelulárních kompartmentech. Jsou to cytoplasma a semiautonómni organely plastidy a mitochondrie, které nesou mimojadernou genetickou informaci. Každý tento buněčný oddíl vlastní svůj odlišný proteosyntetický aparát. Proteiny syntetizované v cytoplasmě představují asi 75 % všech buněčných bílkovinných individuí. Tyto bílkoviny jsou translatovány podle mRNA, která je transkribována z jaderného genomu. U fotosynteticky aktivních buněk je zhruba 20 % všech buněčných bílkovinných molekul syntetizováno v chloroplastech, kde mRNA templát je transkribován podle chloroplastové cpDNA matrice. Jedná se tedy o obrovské množství kopií ve srovnání s faktem, že cpDNA kóduje jen od 50 do 100 proteinů, tRNA a rRNA (Sharma *et* Dubey, 2010). Naproti tomu proteiny syntetizované podle chondriomální mtDNA (mitochondriální DNA) představují jen velmi malou část celkového proteomu buňky, zhruba od 2 do 5 % (Spremulli, 2000).

Syntéza bílkovin probíhá na specializovaných makromolekulárních komplexech známých jako ribozomy, které se skládají z proteinů a ribozomální RNA (rRNA). Jak už bylo zmíněno, syntéza bílkovin probíhá v rostlinné buňce na třech místech a není proto překvapení, že buňky obsahují i tři různé typy ribozomů (cytoplasmatické, plastidové a mitochondriální), skládající se z malých a velkých podjednotek, které spolu reverzibilně asociují a disociují.

Následující detailní popis proteosyntézy bílkovin u rostlin je kompilačním přehledem tohoto nesmírně komplikovaného a komplexního děje. Jako hlavní zdroje informací byly použity následující literární prameny: Alberts *et al.* (1998); Bray *et al.* (2000); Horák *et* Staszková (2002); Kodíček (2007); Lam (1997); Raikhel *et* Chrispeels (2000), Rosypal *et al.* (2001); Sharma *et* Dubey (2010); Snustad *et* Simmons (2009); Spremulli (2000). V těchto publikacích je možné nalézt i doprovodná obrazová schémata, která napomohou čtenáři pochopit průběh popisovaných procesů.

### **1.5.1 Iniciace translace**

Jako mnoho dalších polymerizačních reakcí, i syntéza bílkovin je třístupňovým procesem, zahrnující fáze iniciace, elongace a terminace.

Iniciace proteosyntézy v cytosolu je komplexní událost, která vyžaduje skupinu auxilárních (pomocných) proteinových faktorů známých jako eukaryotické iniciační faktory (eIFs), které jsou rozděleny do šesti tříd podle rolí, kterou vykonávají v iniciaci translace.

Iniciace proteosyntézy je započata tzv. ternárním komplexem, který se skládá z faktoru eIF2, hrající úlohu při (na) GTP dependentním rozpoznávání Met-tRNA a výměně nukleotidů a interaguje s iniciační Met-tRNA (u eukaryot je iniciační tRNA methionin, ovšem

uvnitř peptidového řetězce je methionin přenášen jinou tRNA) v přítomnosti zdroje energie GTP (guanosintrifosfát). Jakmile je ternární komplex zformován, váže volné malé 40S podjednotky ribozomů a to v přítomnosti dalších iniciačních faktorů eIF3 (napomáhají vázat Met-tRNA k 40S podjednotce) a eIF1A, které se podílejí na utváření komplexu. Tento komplex (malá podjednotka navázaná na ternární komplex) dále interaguje s čepičkovou strukturou na 5' konci mRNA. Čepička představuje atypický nukleotid 7-metylguanidin, připojený na 5' konec mRNA trifosfátovým můstkem a slouží jako rozpoznávací místo pro sestavení iniciačního komplexu. Tento krok vyžaduje přítomnost faktorů třídy eIF4 (eIF4A, eIF4B, eIF4E a eIF4G), které tuto čepičku na mRNA rozpoznávají, usnadňují interakci s 40S podjednotkou na mRNA a rozvíjejí sekundární strukturu mRNA. Malá podjednotka poté musí nalézt tzv. AUG start kodon, který je iniciačním kodonem u více než 90 % všech mRNA a od kterého začíná být mRNA čtena. Tento proces je označován jako skenování, neboť 40S podjednotka s navázanou Met-tRNA migruje od čepičky na 5' konci směrem ke 3' konci mRNA a hledá start kodon AUG. Proces skenování vyžaduje energii, která se uvolňuje hydrolyzou ATP. Ve většině případů je při skenování vybrán první AUG iniciační kodon na 5' konci molekuly mRNA, i když účinnost s jakou se daný kodon AUG pro iniciaci translace využívá, závisí na přiléhající nukleotidové sekvenci. Purin (A či G) umístěný tři báze proti směru translace od start kodonu AUG a G, který za ním bezprostředně následuje, jsou nejdůležitější a ovlivňují účinnost translace více než desetinásobně, zatímco změny v jiných bázích této iniciační sekvence čítající 11 nukleotidů, snižují účinnost iniciace translace v menší míře. Tyto požadavky na sekvenci se označují jako pravidla Kozakové, podle Marilyn Kozakové, která je navrhla jako první. V dalším kroku je velká podjednotka 60S ribozomu připojena k malé podjednotce, která „drží“ mRNA a Met-tRNA ve správné orientaci. Během této fáze je GTP hydrolyzováno a eIF2 uvolněn jako komplex eIF2:GDP (v této fázi jsou disociovány i ostatní iniciační faktory).

Mechanismus biosyntézy proteinů v cytoplasmě se jeví u rostlin a ostatních eukaryotních organismů velmi podobný. Jedním z rozdílů se zdá být přítomnost dvou různých eIF4F faktorů (třída eIF4), které se podílejí na rozpoznávání 5' čepičky před interakcí mRNA a 40S ribozomální podjednotky. Rostliny obsahují dvě formy tohoto iniciačního faktoru, které jsou rozlišovány jako eIF4F a eIF(iso)4F. Zdá se, že eIF(iso)4F je schopen interagovat s cytoskeletem a zároveň může napomáhat při lokalizaci translace určitých mRNA na specifická místa buňky, neboť podstatná část syntézy bílkovin se pravděpodobně odvíjí v definovaných částech cytoplasmy, kde mRNA a ribozomy interagují s cytoskeletárními

elementy. Tato asociace může mít za následek přemístění a lokalizaci specifických mRNA do určitých míst v buňce během diference a vývoje.

Iniciace biosyntézy bílkovin je přesně regulována jako odpověď na celou řadu environmentálních a fyziologických změn. Stresy jako anaerobiosa, teplotní šok nebo virové infekce snižují cytoplasmatickou syntézu proteinů. V savcích, kvasinkových a s největší pravděpodobností i v rostlinných buňkách je iniciace proteosyntézy regulována v několika směrech. Jeden z klíčových faktorů představuje iniciační faktor eIF2, který bývá, jak bylo zmíněno výše, uvolňován při iniciaci jako eIF2:GDP komplex. Pokud se má tento faktor účastnit další iniciace, je nutná jeho regenerace, která spočívá ve výměně GDP za GTP. Tato nukleotidová výměna je důležitým regulačním krokem v translaci. Faktor eIF2 váže GDP a k jeho výměně za GTP, uskutečněné výměnnou guanin nukleotidovou reakcí, je nezbytný další pomocný proteinový faktor eIF2B. Jestliže k této výměně GDP za GTP nedojde, eIF2 není regenerován a nemůže následně docházet k iniciaci translace a syntéza proteinů je poté brzy zastavena. Zdá se, že buňky regulují výměnu nukleotidů a tím následnou dostupnost eIF2B:eIF2 komplexu zamezením disociace tohoto komplexu fosforylací eIF2 faktoru protein kinázou, čímž je zabráněno disociaci eIF2 od eIF2B a proto je redukováno množství dostupného eIF2 pro iniciaci proteosyntézy. Není dosud přesně známo, zda je fosforylace eIF2 klíčovou událostí při regulaci iniciace translace u rostlin, tento model je však uplatňován u savců a kvasinek. Některé důkazy ovšem nasvědčují o funkční podobnosti tohoto systému. Sekvence ESTs (expressed sequence tags) získané z rýže a huseníčku naznačují, že tyto rostliny obsahují ve svých genomech savčí a kvasinkové homology subjednotek eIF2B. Navíc byla u rostlin potvrzena přítomnost proteinových kináz fosforylujících eIF2.

Rostliny trpící deficitem kyslíku, tzv. hypoxií, jako důsledku zaplavení, reagují na tento stres změnou kvality a kvantity transkripce a translace a biosyntéza cytoplasmatických proteinů je poté značně redukována snížením poměru iniciace translace. Ačkoli není přesně znám podrobný mechanismus této regulace, zdá se, že důležitým faktorem může být kovalentní modifikace iniciačního faktoru eIF4A. Tento faktor usnadňuje interakci malé podjednotky ribozomu s mRNA a pomáhá rozvolňovat sekundární strukturu mRNA při skenování a vyhledávání iniciačního kodonu AUG na 5' konci. Během hypoxie nemůže oxidativní fosforylace poskytovat buňce dostatek energie, a proto u ní začne dominovat fermentační metabolismus. Jako důsledek je snížena hladina syntézy většiny běžných metabolických bílkovin, zatímco syntéza enzymů glykolýzy a etanolového kvašení je zvýšena (proto je typické, že v raných fázích anaerobiosy je acidifikován cytosol syntézou laktátu). Načasování eIF4A fosforylace přibližně koresponduje s poklesem intracelulárního pH. Toto

snížení pH může sloužit jako druhý posel regulace aktivity proteinových kináz a fosfatáz, které determinují fosforylaci eIF4A.

### **1.5.2 Elongace proteinového řetězce**

Elongace neboli prodlužování peptidového řetězce je založeno na postupném přidávání aminokyselin a tvorbě peptidové vazby mezi nimi. K tomuto procesu je zapotřebí funkční ribozom (80S), na jehož povrchu jsou tři důležitá místa – P, A a E. V prvním kroku elongace translace je v P místě (peptidyl-tRNA vázající místo) rostoucí polypeptidový řetězec kovalentně připoután k tRNA. V tuto chvíli je A místo (aminoacyl-tRNA vázající místo) prázdné a je uvolněné ke čtení dalšího kodonu na mRNA, zatímco E místo (exitové místo) je obsazeno tRNA z předešlého cyklu, která uvolňuje nesenou aminokyselinu ještě před tím, než opustí ribozom. V dalším kroku elongace přistupuje do A místa ribozomu příslušná aa-tRNA (aminoacyl-tRNA), která vytváří spolu s elongačním faktorem eEF1 a s GTP ternární komplex, který napomáhá vazbě aa-tRNA do A místa funkčního ribozomu. GTP je nezbytný právě pro vazbu aminoacyl tRNA do místa A, ale nedochází k jeho štěpení, dokud nedojde k vytvoření peptidové vazby. Následně enzym peptidyltransferasa katalyzuje na úkor energie uvolněné hydrolyzou esterové vazby aa-tRNA vznik peptidové vazby mezi peptidovým řetězcem a novou aminokyselinou. Aktivita tohoto klíčového enzymu je soustředěna spíše do molekuly 23S rRNA 50S podjednotky ribozomu a nové výzkumy ukazují, že v tomto katalytickém kroku hrají tedy významnou úlohu rRNA jako ribozymy. Po rozštěpení GTP se eEF1:GDP z ribozomu uvolní. Výsledkem tohoto kroku tedy je, že právě syntetizující se (nascentní) polypeptid je prodloužen o jeden aminokyselinový zbytek a je vázán na tRNA v A místě, zatímco tRNA v P místě v tomto čase neváže žádnou aminokyselinu, hovoříme o tzv. deacylované tRNA. Dále je celý komplex translokován (katalyzováno enzymem peptidyltransferasou), což zahrnuje přesun deacylované tRNA z P do E místa, peptidyl-tRNA v A místě je přesunuta do P místa a ribozom je posunut relativně k mRNA přesně o tři nukleotidy a tím se další kodon mRNA dostane do pozice schopné čtení novou molekulou aa-tRNA, která vstoupí na uvolněné A místo. Ribozom během translokace prochází konformačními změnami, a proto se může pohybovat po molekule mRNA. Energie pro pohyb ribozomu vzniká hydrolyzou GTP. Posun o méně nebo více než tři nukleotidy by způsobil posun čtecího rámce, který je definován jako sled nukleotidových tripletů, které jsou postupně umísťovány do místa A ribozomu během translace mRNA a pravděpodobně by tato změna vyústila v syntézu inaktivního proteinu. Celý výše popsany proces trvá méně než 0,05 vteřiny.



Na jedné mRNA může být připojeno mnoho ribozomů a dochází tak k simultánní translaci mRNA. Tento proteiny syntetizující komplex se nazývá polyzom. Zdá se, že množství polyzomů je v rostlinách při stresu suchem snižováno tím více, čím je sucho intenzivnější. Rostlinné druhy, které mohou za sucha přežít, vykazují vyšší schopnost produkce polyzomů ve svých pletivech.

### **1.5.3 Terminace translace**

Elongace polypeptidového řetězce je ukončena ve chvíli, kdy je v místě A rozpoznán jeden ze tří terminačních neboli stop kodonů nazývaných amber (UAG), ochre (UAA) a opal (UGA). Komplex specifických rozpustných proteinů známých jako uvolňovací faktory eRF1 a eRF3 se za účasti GTP vážou na stop kodon v místě A. Ve stejný čas, i když to není dosud jasně potvrzeno, dochází k uvolnění deacylované tRNA v E místě. Funkcí uvolňovacího faktoru je vnést do P místa vodu, kterou váže ve své struktuře a tím dochází k hydrolýze esterové vazby mezi vznikajícím polypeptidovým řetězcem a poslední tRNA. Tato reakce je katalyzována peptidyltransferasou umístěnou na ribozomu. Nakonec je funkční ribozom disociován od mRNA, podjednotky se od sebe oddělí a mohou participovat v dalších cyklech translace.

## **1.6 Biosyntéza proteinů v chloroplastech jako specifikum rostlin**

Chloroplasty jakožto semiautonomní organely obsahují nezávislou genetickou informaci v podobě kruhové cpDNA, která kóduje od 50 do 100 proteinů a tRNA a rRNA. Celá řada proteinů kódovaných cpDNA funguje v oligomerních proteinových komplexech spolu s proteiny kódovanými jadernou DNA. Příkladem může být pravděpodobně nejrozšířenější protein na planetě ribuloza-1,5bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (Rubisco), který je složen z 16 proteinových subjednotek – 8 kopií malých podjednotek (SSU) a 8 kopií velkých podjednotek (LSU). Gen *rbcS*, který kóduje SSU je kódován nukleární DNA, zatímco gen *rbcL* kódující LSU je nesen cpDNA. Pro syntézu tohoto enzymu je tedy nezbytná exprese obou těchto genomů a koordinace tří kompartmentů – jádra, cytosolu a chloroplastu, přičemž ribozomy, mRNA a auxilární faktory jsou pro každý kompartment specifické.

Díky endosymbiotickému původu sdílí plastidy mnoho podobností s translací u bakterií. Iniciační tRNA je proto v případě chloroplastů N-formylovaný methionin (N-formyl je přidáván formyltransferasou) a bývá často posttranslačně odštěpen. Pravděpodobně nejvýznamnější rozdíl mezi translačním systémem v cytosolu a v chloroplastech tkví v procesu selekce iniciačního signálu na mRNA. Ve srovnání s cytoplasmatickou nese

chloroplastová mRNA na 5' konci čepičku, která navádí iniciační faktory. Velmi často je také transkribována jako polycistronická mRNA, která obsahuje několik čtecích rámců. V bakteriálních systémech se 16S rRNA, která je součástí malé 30S podjednotky ribozomu vyhledávající iniciační kodon, může párovat s bázemi na krátkém úseku mRNA umístěném přibližně sedm nukleotidů proti směru translace od iniciačního kodonu AUG. Tato tzv. Shine-Dalgarnova polypurinová sekvence (AGGAGG) se váže vodíkovými můstky na komplementární polypyrimidinovou sekvenci blízko 3' konce 16S rRNA malé podjednotky ribozomu a tím tato interakce napomáhá nalezení iniciačního kodonu. Navíc sekundární struktura mRNA plní důležitou úlohu v determinaci efektivnosti iniciace translace.

Zdá se, že chloroplastovou mRNA rostlin lze pravděpodobně rozdělit podle vzoru organismu *Euglena gracilis* (krásnoočko štíhlé), které je modelovým organismem využívaným při výzkumu mechanismu rozpoznávání iniciačního AUG kodonu prokaryotními ribozomy v chloroplastech, na dvě skupiny. První skupina mRNA neobsahuje žádné konzervované signální sekvence na 5' konci netranslatovaného regionu mRNA, tzv. 5' UTR (s 5' UTR sekvencí mohou zřejmě interagovat některé jaderné proteiny, které mohou působit jako regulátory translace chloroplastových proteinů). Start translace u prvního typu mRNA je specifikován iniciačním kodonem AUG ve slabě nebo zcela nestrukturovaném (myšleno sekundárně strukturovaném) úseku mRNA a také v tomto případě není přítomna Shine-Dalgarnova sekvence. U druhého typu chloroplastové mRNA je Shine-Dalgarnova sekvence přítomna, a to před start kodonem, který je umístěn v regionu silně sekundárně strukturované mRNA.

### **1.7 Degradace proteinů a odpověď rostliny na stresy**

Odbourávání proteinů je neustálý proces, kterým buňka odstraňuje poškozené proteiny, recykluje aminokyseliny a reguluje aktivitu proteinů, které již nepotřebuje. Abnormální proteiny vznikají v buňkách jako výsledek mutace, chyb v proteosyntéze nebo následného skládání bílkovin, spontánní denaturace, chorob, stresu či oxidačního poškození. Pokud by tyto chybné proteiny nebyly buňkou odstraněny, hrozilo by reálné nebezpečí jejího poškození v důsledku utváření velkých nerozpustných agregátů těchto bílkovin. Neméně důležitou rolí degradace bílkovin je umožnění akumulace subjednotek oligomerických proteinových komplexů ve správných stechiometrických poměrech a udržování vhodného vztahu mezi enzymy a jejich kofaktory.

Proteolýza bílkovin také zajišťuje aminokyseliny nezbytné pro udržení homeostáze a pro růst buňky a celé rostliny. Přibližně polovina všech proteinů v rostlině je nahrazena každý

čtvrtý až sedmý den a v mnoha případech jsou nové proteiny syntetizovány z recyklovaných aminokyselin (při klíčení je většina aminokyselin potřebných k růstu dodávána odbouráváním zásobních proteinů semene).

V neposlední řadě se degradace proteinů velkou měrou podílí na regulaci celé řady biologických procesů, neboť enzymy katalyzující první krok určité biochemické reakce či enzymy limitující její rychlost jsou často bílkoviny s „krátkým životem“ a to zejména kvůli jejich proteolytické degradaci. Rostliny tak mohou regulovat aktivitu určitých metabolických drah jednoduchou redukcí syntetizovaných proteinů. Celá řada klíčových regulačních proteinů je proteolyticky regulována, včetně efektorů buněčného cyklu, vývoje či diferenciaci (příkladem je degradace aktivní formy Pfr fytochromu A, který je biologicky aktivní a působí jako fotoreceptor k iniciaci celé řady světlem regulovaných vývojových procesů).

K tomu, aby nebyly v buňce degradovány všechny proteiny bez rozdílu, musí být tento proces odbourávání důmyslně regulován a kontrolován. Proteolýza v rostlinách ve většině případů vyžaduje ATP, neboť hydrolýza peptidové vazby je energeticky výhodná a tak ATP hydrolýza působí jako regulátor proteolytické aktivity, zejména přes pomocné proteiny, které rozpoznávají polypeptidy určené k degradaci.

Odbourávání proteinů je u rostlin zajišťováno v různých kompartmentech specifickými proteolytickými drahami, které reflektují evoluční původ každého kompartmentu. Proto je proteolytický mechanismus v semiautonorních organelách více podobný bakteriálnímu systému než tomu, který se uplatňuje v cytosolu buňky. Jednou z proteáz působících v chloroplastech je homolog ClpAP proteasy *Escherichia coli*. ClpAP proteasový systém je složen ze dvou podjednotek, ClpP serinové proteasy (21 kDa) a ClpA ATPasy (81 kDa), která souží jako aktivátor proteasové aktivity ClpP a proteinů určených k degradaci. Aktivita tohoto multimerního enzymového komplexu působícího ve formě dvou heptamerních prstenců ClpP proteáz spolu s pravděpodobně jedním heptamerním prstencem ClpA, je důležitá hlavně při zamezení akumulace poškozených proteinů např. během senescence listů.

Cytoplasmatické proteiny s krátkou dobou života jsou označeny na N konci krátkou polypeptidovou sekvencí, bohatou na prolin (P), kys. glutamovou (E), serin (S) a threonin (T). Tento úsek je nazýván PEST sekvence a zdá se, že proteiny s touto sekvencí jsou mnohem více proteolyticky štěpeny a ta tedy působí jako proteolytický signál.

V mnoha případech jsou proteolytické dráhy aktivovány při podmínkách, které způsobují denaturaci proteinů (teplota, dehydratace, těžké kovy atd.), a tím jejich poškození nebo nesprávné složení. To způsobuje zvýšené množství hydrofobních zbytků na povrchu

proteinu, neboť tato hydrofobní místa jsou zpravidla ukryta uvnitř polypeptidového řetězce, aby tak bylo zabráněno jejich interakci s molekulami vody. Poškozené proteiny na svém povrchu nesou tato hydrofobní rezidua, a ta pravděpodobně poskytují vazebná místa pro bílkoviny, které regulují aktivitu různých proteáz.

Degradace velké většiny cytoplasmatických a jaderných proteinů je realizováno proteazomem, komplexem proteinů, jehož molekulová hmotnost je vyšší než 1,5 mDa. Celá biochemická kaskáda katalyzovaná proteazomem vyžaduje účast produktů více než sta genů. Proteiny, které jsou určeny k odbourání, musí být nejprve modifikovány kovalentní vazbou s malým proteinem ubikvitinem, který představuje vysoce konzervovaný protein s identickou aminokyselinovou sekvencí u všech rostlin. Ubikvitin je bílkovina obsahující ve svém řetězci 76 aminokyselinových zbytků. Ubikvitinační enzymový komplex uskutečňující sérii složitých reakcí, vedoucích k označení proteinů, které jsou chybně poskládané nebo neúplně sestavených supramolekulárních proteinových struktur, se skládá z ubikvitin aktivačního enzymu (UAE), ubikvitin konjugačního enzymu (UCE) a ubikvitin ligasy (ULE). Celá ubikvitinační reakce je odstartována kovalentní vazbou karboxylové skupiny na C konci ubikvitinu s thiolovou SH skupinou cysteinu na UAE a vzniká tak thioesterová vazba. Tato reakce vyžaduje hydrolyzu ATP na AMP a pyrofosfát. V dalším kroku je ubikvitin přenesen na SH skupinu cysteinu v proteinovém řetězci UCE, zatímco protein, který je určený k degradaci (nese degradační signál), je rozpoznán ULE, který s ním utváří nekovalentní komplex. Ubikvitin je dále přenesen z UCE na cílový protein, se kterým je kovalentně spojen isopeptidovou vazbou mezi karboxylovou skupinou glycinu na C konci ubikvitinu (v pozici 76) a  $\epsilon$ -amino skupinou lyzinu na cílovém proteinu. Přenos ubikvitinu na již připojený ubikvitin je několikrát opakován a vzniká tak polyubikvitinový řetězec (karboxyl připojovaného ubikvitinu je vždy navázán na lyzinovou aminoskupinu v pozici 29, 48 nebo 63 polyubikvitinového řetězce). Většinou musí být připojeny minimálně asi čtyři, ale až padesát ubikvitinů před tím, než může být protein dopraven do proteazomu k odbourání. V dalším kroku jsou UCE a ULE disociovány a komplex ubikvitin:protein je transportován k proteazomu, uvnitř kterého je protein hydrolyticky štěpen na aminokyseliny. V tomto kroku jsou ubikvitiny z komplexu uvolněny a mohou být znovu využity. Za objev ubikvitinem zprostředkovaného odbourávání proteinů získali v roce 2004 A. Hershko, I. Rose a A. Ciechanover Nobelovu cenu.

Proteazom 26S je složen z 20S proteazomového jádra a z 19S regulačních podjednotek, které se vážou na oba konce 20S jádra. Jádro proteazomu má charakter dutého válce a je složeno ze čtyř prstenců ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) přiložených k sobě, přičemž každý z těchto

prstenců je sestaven ze sedmi polypeptidů. Centrální kanál uprostřed jádra obsahuje aktivní místa proteolýzy. Umístění katalyzačního centra uvnitř kanálu napomáhá chránit jiné buněčné bílkoviny před degradací. Za hydrolyzy ATP jsou na jádro proteazomu navázány 19S regulační proteiny (čepičky), které se skládají nejméně z deseti různých proteinových podjednotek a pravděpodobně vážou proteiny určené k degradaci a vtahují je dovnitř dutiny proteazomu, kde jsou rozloženy na krátké peptidy, které jsou následně uvolněny do cytoplasmy. Tento systém odbourávání bílkovin se u rostlin uplatňuje mimo jiné také v případech poškození rostlin teplotním šokem nebo chybně syntetizovaného proteinu.

### **1.8 Modifikace a sbalování proteinů**

#### **1.8.1 Proteolýza jako modifikace bílkovin**

Z principu iniciace translace vyplývá, že první aminokyselinou u všech polypeptidů je methionin (u eukaryot), který je asi u poloviny všech proteinů odštěpen asociovanou ribozomální Met-aminopeptidázou. U prokaryot je iniciační aminokyselinou formylovaný derivát methioninu (též mitochondrie a plastidy), přičemž formylová skupiny je téměř vždy odstraněna za pomoci asociované ribozomální deformylasy. O tom, zda bude methionin z N konce odstraněn, rozhoduje z velké části aminokyselina na druhé pozici, která může být příležitostně také enzymaticky odštěpena. Aminokyselinové zbytky na C konci polypeptidů jsou odstraňovány jen ve vzácných případech. Další příklad uplatnění proteolytické modifikace bílkovin je odstranění signální sekvence poté, co protein zaujme příslušné místo v buňce. Proteolytická úprava se také uplatňuje při generování aktivních peptidových hormonů po poranění rostliny, jako je tomu například u systeminu, který vzniká proteolytickým štěpením jeho prekurzoru – prosysteminu, který je složen z 200 aminokyselin. Ke štěpení prosysteminu dochází mezi 178-179 a 196-197 aminokyselinovým zbytkem. Tato aktivní forma hormonu je sekretována poraněnými buňkami a transportována do ostatních částí rostliny, kde se podílí na indukci syntézy obranných proteinů.

#### **1.8.2 Svinování proteinů**

Proteiny musí zaujmout po ukončení translace či velmi často ještě kotranslačně správné třídimenzionální biologicky aktivní uspořádání. Většina proteinů (především multidoménoých) je svinována v cytoplasmě současně při jejich biosyntéze, tedy kotranslačně. Naproti tomu bakteriální proteiny a některé chloroplastové a mitochondriální proteiny jsou svinovány teprve po ukončení jejich proteosyntézy, tedy posttranslačně. Proces svinování vedoucí ke správné konformační struktuře je velmi komplexní a o zákonitostech

jeho průběhu zatím nemáme dostatečné informace. Podle současného modelu se zdá, že nově syntetizované bílkoviny se nejprve sbalují do nestabilního mezistupně. Vzniknou částečně složené molekuly nazývané roztavená globule (molten globule). Ty mají již vybudovanou základní terciální strukturu, postranní řetězce (zejména hydrofobní) však ještě nejsou zcela fixovány. Částečně složená bílkovina poté podstupuje celou řadu interakcí mezi postranními řetězci aminokyselin, dokud není dosaženo nejstabilnější konformace celého proteinu. Malé jednořetězcové bílkoviny se obvykle svinují do své nativní struktury samovolně a zdá se tedy, že primární sekvence polypeptidu obsahuje veškeré nezbytné informace potřebné k dosažení jejich správné konformace. Větší komplexnější bílkoviny potřebují ke správnému svinutí asistenci jiného proteinu ze skupiny chaperonů.

### **1.8.3 Chaperony**

Chaperony jsou proteiny, které se vážou na jiné proteiny a uplatňují se při svinování nově vzniklých proteinů a napomáhají nalézt jejich prostorové uspořádání odpovídající nativní konformaci. Dále tuto konformaci stabilizují a také mohou předcházet inaktivaci proteinů. Chaperony neřídí přímo specifiku svinování, ale zabraňují spíše utváření nesprávných interakcí v polypeptidech, mezi polypeptidy a mezi polypeptidy a jinými makromolekulami, čímž zvyšují výtěžnost plně funkčních proteinů.

Molekulární chaperony se dělí na dvě hlavní skupiny. První z nich je rodina chaperonů Hsp70 vyskytující se v bakteriích i v eukaryotických buňkách. Tato skupina chaperonů se uplatňuje na počátku svinovacího procesu, neboť se vážou spolu s kochaperonem Hsp40, který usnadňuje interakci Hsp70:ATP komplexu s nesvinutým proteinem na hydrofobní místa na povrchu nascentního polypeptidu, aby tak zabránily nesprávné konformaci nebo agregaci s ostatními proteiny. Tato agregace je výsledkem snahy hydrofobních aminokyselin o minimalizaci kontaktu s vodním prostředím. Hsp70 má dvě domény: N konec nese ATP vazebné místo, zatímco C konec se svinuje do konformace, která váže krátkou peptidovou sekvenci na cílovém proteinu. Pokud je v ATP vazebném místě vázáno ATP, interakce mezi Hsp70 s cílovým polypeptidem je oslabena a dochází k jejich rozvolnění. Syntéza těchto proteinů je zvýšena (up-regulována) jako odpověď na teplotní stres.

Proteiny teplotního šoku (heat shock proteins – HSPs) zahrnují rodinu proteinů, které jsou exprimovány jako odpověď na určité stimuly a akumulují se v rostlinách při stresu suchem (Jiang *et* Huang, 2002) a zdá se, že zamezují denaturaci proteinů při buněčné dehydrataci a fungují jako molekulární chaperony, uplatňující se při skládání nově vzniklých proteinů, stabilizaci konformace proteinů, degradaci porušených proteinů a předcházení

inaktivace proteinů. Nízkomolekulární HSPs (15-30 KDa) jsou nazývány malé proteiny teplotního šoku (small heat shock proteins – sHSP). Rodina sHSP proteinů jsou skupinou molekulárních chaperonů (indukovaných za stresových podmínek), které zamezují polymerizaci denaturovaných proteinů. Protein Hsp26 z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* má pozoruhodnou schopnost přímé percepce zvýšené teploty a „přepnutí se“ z neaktivního stavu do aktivní chaperonové formy (Xue *et al.*, 2009). Gen *HSP26* byl izolován a přenesen do *A. thaliana* cv. Columbia a modifikované huseničky byly vystaveny mrazu (-10 °C, 2,5 hod). Akumulace malondialdehydu (MDA), často využívaná jako indikátor peroxidace lipidů (MDA je hlavním produktem peroxidace lipidů), a relativní elektrická konduktivita (REC) demonstrující stupeň poškození membrán, byly po mrazu u transformantů nižší, ve srovnání s netransformovanými rostlinami. Analogicky s tím byl u transgenních rostlin zjištěn vyšší obsah prolinu, cukrů a dramaticky zesílená exprese COR genů (cold-regulated genes) – *COR15A*, *RD29A* a genů metabolismu prolinu – *AtP5CS1*, *AtP5CS2*, *AtP5CR* a *AtProDH*. Výše uvedené postuluje, že kvasniční protein Hsp26 by se mohl podílet na ochraně integrity buněčných membrán a zprostředkovaně na aktivaci syntézy prolinu a transportních drah této iminokyseliny a také hrát důležitou roli při aktivaci genů spojených se stresem, což může přispívat ke zvýšení tolerance rostlin při mrazovém působení a dehydrataci obecně. Rodina HSP proteinů je skupina molekulárních chaperonů a akumuluje se v rostlinách při stresu suchem (Jiang *et al.*, 2002) a zdá se, že zamezují denaturaci proteinů při buněčné dehydrataci. Sato *et al.* (2008) publikovali transgenní linie rýže s overexprimovaným genem sHSP17.7. Tyto transgenní rostliny vykazovaly zvýšenou toleranci k suchu. Dalším příkladem akcelerace tolerance k dehydrataci je práce Cho *et al.* (2009), v níž je popsána zvýšená tolerance k suchu u transgenních rostlin tabáku s konstitutivní expresí genu NtHSP70-1.

Práce Tomassini *et al.* (2008) potvrdila indukci genů HSPs u ječmene za sucha, a to konkrétně genů GFA2, HSP 70 a HSP91.

### **1.8.4 Chaperoniny**

Druhou skupinou molekulárních chaperonů jsou chaperoniny, které představují druhý funkční svinovací komplex. Chaperoniny představují rozmanitější a strukturálně komplexní skupinu chaperonů. Jsou dále rozděleny na dvě rodiny: skupinu GroEL a skupinu TRiC. Rodina chaperoninů GroEL se nachází v bakteriích, mitochondriích a chloroplastech, zatímco skupina chaperoninů TRiC se nalézá v cytosolu eukaryotních buněk. Chaperoniny GroEL mají cylindrický tvar a jsou sestaveny ze dvou na sebe přiložených prstenců, přičemž každý

z nich je složen ze sedmi podjednotek mající hmotnost 60 kDa. V rostlinách jsou plastidové a mitochondriální GroEL kódovány v jádře a do organel jsou následně transportovány. GroEL pracuje v kooperaci s chloroplastovým homologem GroES *Escherichia coli*, nazývaným cpn10 nebo cpn21 (24 kDa). Protein cpn10 má neobvyklou strukturu, neboť na N konci nese transitní peptid, specifikující chloroplastovou lokalizaci a dále pak dvě sekvence složené z přibližně 100 aminokyselin, které jsou homologní bakteriálnímu GroES. Obě tyto repeticce jsou odděleny krátkým spojovníkem. Celý proces svinování proteinů v chloroplastech a mitochondriích za pomoci GroEL a GroES začíná připojením proteinu GroES, majícího funkci poklopu, ke spodnímu prstenci komplexu GroEL a vazbou sedmi molekul ADP, tedy jedné molekuly ADP na každou polypeptidovou podjednotku tohoto heptamerního prstence. Nesvinutý protein je vázán uvnitř centrální dutiny svrchního prstence GroEL, která je široká asi 50 Å ( $10^{-10}$  m). Po vazbě sedmi molekul ATP na horní prsteneček (1 ATP na každou subjednotku) a jejich následné hydrolyzy dochází k uvolnění všech 14 molekul ADP (7 z horního prstence a 7 z dolního prstence GroEL) a k disociaci GroES. V dalším kroku dochází k opětovné interakci mezi náhodně zvoleným prstencem GroEL (horním či spodním) s GroES a vazbě 7 molekul ATP. Výsledkem tohoto procesu je, že v polovině případů je polypeptid zachycen v dutině komplexu a podstoupí kaskádu reakcí vedoucí k jeho sbalení. Následná hydrolyza ATP zesílí interakci mezi GroEL a GroES (ADP je stále vázáno na subjednotkách GroEL). Navázání dalších sedmi molekul ATP a jejich hydrolyza spouští disociaci GroES z komplexu a uvolnění již svinutého polypeptidu. Z komplexu se také uvolňuje 14 molekul ADP. V případě, že je svinutí nekompletní či nesprávné, polypeptid je znovu vázán a cyklus se opakuje.

Sbalování proteinů v cytosolu rostlin je komplexní jev, a záleží na tom, zda je protein syntetizován na polyzomech přichycených na endoplazmatickém retikulu nebo na volných polyzomech. Uchycení ribozomů na endoplazmatické retikulum závisí na tom, s jakým ze dvou proteinových komplexů vznikající peptid na ribozomu interaguje. Jestliže vznikající peptidový řetězec nese specifickou signální sekvenci na N konci, je rozpoznán částicemi rozpoznávající signál (SRP), které jsou tvořené bílkoviny a malou molekulou RNA a vážou se na právě translatovaný protein. Tyto částice zprostředkovávají interakci ribozomu s membránou endoplazmatického retikula přes SRP receptor, na který se SRP protein váže a protein je dále syntetizován do lumenu endoplazmatického retikula, kde dochází k odštěpení signální sekvence a následnému sbalení proteinu za účasti endoplazmatických chaperonů. Jiný případ nastává tehdy, neobsahuje-li syntetizovaný protein signální sekvenci. Vznikající protein je potom vázán alternativním komplexem asociovaným se syntetizujícím se řetězcem



(NAC). Zdá se, že NAC zabraňuje nesprávné lokalizaci proteinu, neboť zabraňuje vazbě SRP a peptid tak nemůže být translokován do cisteren retikula. Nascentní polypeptidové řetězce interagují se specifickými chaperony v cytoplasmě, konkrétně s Hsp70 a jeho kochaperonem Hsp40. Tyto chaperony brání agregaci nesbalených proteinů. Zdá se, že některé proteiny v cytoplasmě musí interagovat s chaperonem nazývaným TRiC, který plní ekvivalentní funkci jako komplex GroES:GroEL v chloroplastech. TRiC se skládá nejméně ze šesti různých polypeptidů a má obdobnou cylindrickou strukturu s centrální dutinou jako detailně popsáný GroES:GroEL komplex.

### **1.9 Transport proteinů**

Některé proteiny se vyskytují jedinečně jen v určité struktuře, kompartmentu nebo membráně, naproti tomu velmi podobné proteiny se srovnatelným aminokyselinovým řetězcem, strukturou a funkcí se mohou vyskytovat i ve více než jednom kompartmentu. Příkladem mohou být proteiny vodních kanálů, tzv. aquaporiny, které lze nalézt jak v tonoplastu tak v plasmatické membráně. Z tohoto důvodu buňky potřebují nezbytný aparát sloužící k sortování každého proteinu a možnost adresovat je do příslušného místa v buňce či do extracelulárního prostoru. Proto nesou všechny proteiny, vyjma těch, které zůstávají v místě translace, jednu nebo více specifických domén (targeting domains), které mají funkci adresových značek. Cílové domény jsou obvykle krátké peptidové nebo aminokyselinové motivy, ale mohou to být také glykany (oligosacharidy) jako v případě savčích lysosomálních hydrolas. Cílové domény jsou lokalizovány především na N-terminálním konci proteinu, ovšem mohou být přítomny také na C-terminálním konci či někde jinde v aminokyselinové sekvenci. Specifický aparát buňky pracuje s informacemi, které nesou tyto cílové domény a translokují nebo naopak zadržují protein do/v určitém kompartmentu. Každá organela či membránový systém je determinován specifickou cílovou značkou, na které závisí, kam a zda bude protein transportován a lokalizován. I když je cílová doména nezbytná pro transport proteinů, nemusí být vždy součástí aktivního proteinu. Velmi často se protein stává funkční a zralý až po proteolytickém odštěpení této domény v cílové organelle.

K tomu, aby byl protein v buňce správně lokalizován, musí ve většině případů překonat nejméně jednu membránu. Ovšem hydrofilita povrchu, kterou vykazuje většina proteinů, nedovoluje bílkovinám projít přímo skrz hydrofobní jádro lipidové dvouvrstvy. Taková translokace vyžaduje bílkovinný pór nebo kanál, kterým je protein již schopen projít, ovšem nikoli v globulární konformaci, ale v nataženém nebo nesloženém stavu. Jistého druhu asistenci při procházení polypeptidů skrz póry poskytují molekulární chaperony. Některé

cytosolické chaperony interagují s nově syntetizovanými proteiny, udržují je nesložené, a proto tyto bílkoviny mohou procházet přes proteinové póry do příslušných organel či membrán.

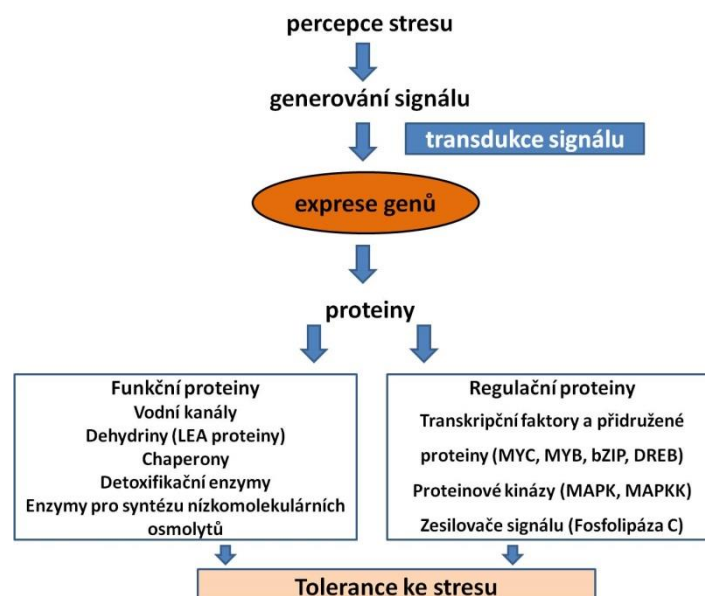
### 1.10 Suchovzdornost rostlin a její determinace

Sucho redukuje růst rostlin, ovlivňuje biochemicko-fyziologické a následně morfologické pochody a způsobuje masivní ztráty na výnosech. Působení sucha se nejčastěji manifestuje redukcí efektivnosti klíčových procesů jako biosyntézy proteinů a nukleových kyselin, fotosyntézy a respirace.

Suchovzdornost je komplexní vlastnost kontrolovaná mnoha kvantitativně vázanými znaky (QTLs – quantitative trait loci). Těmito znaky jsou například účinnost využití vody (WUE – water use efficiency) nebo osmotické přizpůsobení. Tyto QTLs jsou v genomu ječmene lokalizovány na několika chromosomech s hlavním QTLs klastrem na chromozomech 2H a 5H (Tommasini *et al.*, 2008).

Různé práce uvádějí, že při stresu suchem je indukována syntéza řady proteinů, které mají spojitost s biosyntézou osmoprotektantů, HSPs, LEA proteinů, chaperonů, enzymů asociovaných s detoxikací buňky, transkripčních faktorů, kináz a fosfatáz (tzv. krátkodobá, biochemická adaptace), což vede k modifikaci ultrastruktury pletiva rostlin (Sharma *et al.* 2010), a samozřejmě k morfologickým změnám habitu celé rostliny, tzv. dlouhodobá adaptace (Beck *et al.*, 2007). Detailní poznání molekulárních mechanismů podstaty tolerance ke stresům nám může pomoci zlepšit tuto stresovou tolerance u rostlin.

Obrázek č. 2: Faktory stresové tolerance při adaptivní odpovědi rostlin na stres suchem



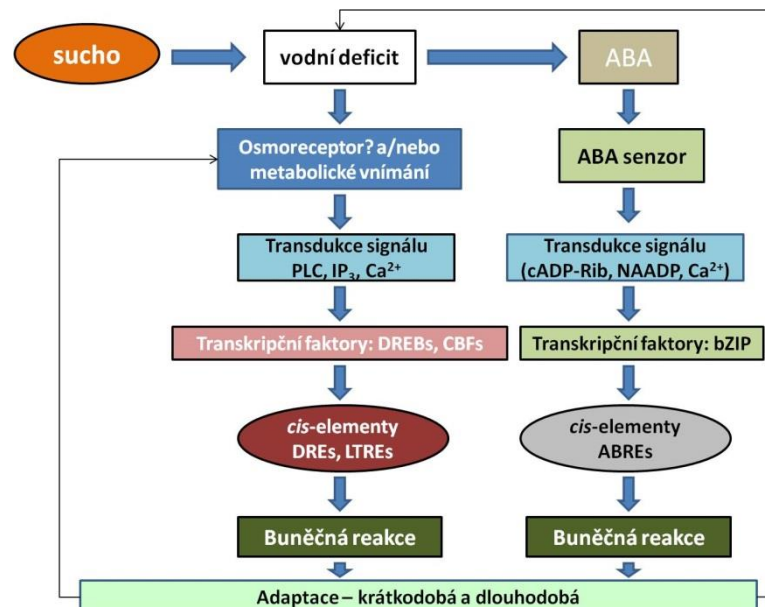
## 1.11 Proteiny indukované suchem

### 1.11.1 Signální dráhy zapojené při expresi suchem indukovaných proteinů

Ingram *et* Bartles (1996) popisují mechanismus vedoucí k expresi suchem indukovaných bílkovin, který odpovídá obecnému buněčnému modelu. Ten zahrnuje komplex signálně-transdukčních kaskád, které lze rozdělit do několika kroků. Jako první je to percepce stimulu, následuje jeho zpracování, které zahrnuje amplifikaci a integraci signálu a posledním krokem je odpověď buňky, respektive organismu jako finální reakce na stimul, vyúsťující v *de novo* expresi genů.

Zdá se, že stres suchem (vodní stres) je vnímán rostlinami na membránách vázanými dvou-komponentními histidinovými kinasami, které jsou aktivovány vysokou osmolaritou. Je tedy pravděpodobné, že zvýšená buněčná osmolarita při ztrátě vody během sucha spouští signální kaskádu vedoucí k odpovědi buňky, resp. celé rostliny na nedostatek vody. Signální receptor aktivuje fosfolipasu C (PLC), která následně hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5 trifosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol, které vykonávají funkci druhých posílů (Alberts, 1998). IP<sub>3</sub> dále uvolní vápenaté ionty z vnitřních rezerv buňky a Ca<sup>2+</sup>-senzor (calcineurin B-like protein, CBL) aktivuje další proteinové kinasy a fosfatasy (Beck *et al.* 2007).

Obrázek č. 3: Schéma kaskády procesů při adaptační odpovědi rostliny



Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki (2006) uvádějí, že z hlediska načasování exprese stresem indukovatelných genů rozeznáváme nejméně dvě skupiny těchto genů, které vykazují

rozdílný expresní profil. Nástup exprese genů řadících se do první skupiny je možné popsat jako rychlý a krátkodobý s maximem exprese dosahujícím po několika hodinách a poté dochází k poklesu. Mnoho z těchto genů kóduje regulační proteinové faktory jako proteiny zinkového prstu, SOS2 podobné proteinové kinasy PKS5, bHLH transkripční faktor, DREB2A a další. Exprese genů v druhé skupině je pozvolná. Tyto geny kódují LEA proteiny, detoxifikační proteiny a enzymy pro syntézu osmoprotektantů.

Opřeme-li se o publikované vědecké práce, můžeme jednoznačně říci, že existují dvě cesty regulace exprese dehydrinových genů či stresových genů obecně – ABA závislý (dependentní) a ABA nezávislý (independentní) regulační systém. Na rozdíl od chladové odpovědi, ve které ABA hraje minoritní úlohu, zdá se, že při suchu ABA spouští hlavní signální dráhu pro odpověď. Následně popsané principy lze vztáhnout obecně na geny aktivované suchem, respektive osmotickým stresem.

Promotorové regiony stresem indukovaných genů obsahují *cis* regulační elementy (*cis*- regulatory acting elements), které jsou důležité molekulární spínače působící při regulaci transkripce dynamické sítě aktivit genů, kontrolující různé biologické procesy včetně reakce na abiotický stres, hormonální odpověď nebo vývojové procesy. Různé transkripční faktory interagují s *cis* elementy promotorů a vytvářejí transkripční iniciační komplex na TATA boxu, který představuje jádro promotoru umístěným před (upstream) transkripčním iniciačním místem. Transkripční iniciační komplex potom aktivuje RNA polymerázu, která začíná transkribovat geny stresové odpovědi. Při tomto procesu dochází k různým interakcím mezi *cis* elementy a transkripčními faktory, což v důsledku působí jako molekulární spínač transkripčních iniciačních událostí. Signály abiotických stresů aktivují transkripční faktory indukci jejich genů, aktivací proteinů (např. fosforylací) a degradací proteinů proteazomem (represivní aspekt) (Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 2005).

Většina dehydrinových a stresových genů obecně jsou citlivé na ABA, neboť obsahují ve svých promotorech *cis* elementy známé jako ABRE (ABA Responsive Elements). Tyto dehydriny jsou proto nazývány jako RAB proteiny (Responsive to Abscisic acid). ABRE *cis* elementy obsahují ACGT sekvenci nazývanou jako G-box (Allagunova *et al.*, 2003). Přítomnost jen jedné kopie ABRE není dostačující k ABA dependentní expresi genů. První ABRE sekvence byla detekována v pšeničném *Em* genu, který je funkční převážně v obilce během pozdní embryogeneze a v *RAB16* genu rýže, který je exprimován jak v dehydratovaném vegetativním pletivu, tak ve zrajícím semeni (Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 2005). Bylo prokázáno, že ABRE elementy interagují s bZIP (basic leucine zipper) transkripčními faktory AREBs (ABRE-binding factor) nebo ABFs (ABRE-binding factors).

Motiv bZIP dává proteinům schopnost vázat další proteiny. AREB/ABF se vážou na ABRE a aktivují tak ABA dependentní expresi genů. Aktivace AREB/ABF proteinů vyžaduje ABA zprostředkovaný signál, zřejmě ve formě ABA dependentní fosforylace. Tu by mohla zajišťovat typ SnRK2 kinasy. Konstitutivní overexprese ABF3 nebo ABR4/AREB2 v *Arabidopsis* vyústila v ABA hypersenzitivitu, redukcí transpiračního poměru a zvýšení tolerance k suchu (Kang *et al.*, 2002) Práce Kim *et al.* (2004) ukázala, že ABF2/AREB1 je nezbytnou součástí glukosové signalizace a jeho overexprese zvyšuje toleranci nejen k suchu, ale také k horku a oxidativnímu stresu. Senzitivita k ABA signálu také vyžaduje ABRE vazebné elementy (ABRE Coupling Elements – CE).

Podle řady prací existují další *cis* regulační elementy v ABA závislé expresi stresových genů. Jedná se o *cis* regulační elementy promotorů MYCR – myelocytomatosis (CACATG) a MYBR – myeloblastosis (TGGTTAG) a s nimi interagující transkripční faktory MYC a MYB. Suchem aktivovaný gen *RD22* u *Arabidopsis* obsahuje ve svém promotoru právě tyto *cis* elementy. Transkripční faktor RD22BP1 (AtMYC2) a MYB transkripční faktor AtMYB2 vážou *cis* regulační element promotorové oblasti genu *RD22* a kooperují při aktivaci tohoto genu. Tyto dva transkripční faktory jsou syntetizovány po akumulaci endogenní ABA, což naznačuje jejich působení až v pozdní fázi stresové odpovědi. Transgenní rostliny, které měly zvýšenou produkci AtMYC2 a AtMYB2, byly senzitivnější k ABA a zároveň vykazovaly vyšší toleranci k osmotickému stresu. V nedávné době bylo prokázáno, že AtMYC2 je transkripční faktor hrající úlohu také v obranné odpovědi regulované kyselinou jasmonovou (Abe *et al.*, 2003).

ABRE je nejdůležitějším *cis* regulačním elementem, ovšem existuje mnoho dalších typů *cis* elementů, které fungují v ABA dependentní genové expresi.

Práce Tommasini *et al.* (2008) studovala aktivaci genů ječmene po stresu suchem a chladem. V této práci byly mimo jiné identifikovány geny indukované suchem, které se účastní transkripčních regulací. Jeden z těchto genů kóduje bazické proteiny se strukturou leucinového zipu – bZIP, které jsou, jak bylo popsáno výše, ABA senzitivními transkripčními faktory aktivovanými za osmotického stresu (obecně sucho, chlad, mráz a salinita). Dalšími geny hrající úlohu při transkripční kontrole byly HD-ZIP a rodina MYB, které jsou upregulovány v *Arabidopsis* při dehydrataci (HD-ZIP) a dehydrataci a chladu (MYB).

Příkladem provázaných spojitostí mezi dehydriny a ABA mohou být práce Wise *et Tunnacliffe* (2004) a Bonetta *et Mc Court* (2002), kteří po diferenciaci embrya prokázali syntézu dehydrinů ve vztahu k ABA. Byla popsána korelace mezi transkriptem genu dehydrinu a obsahem endogenní ABA u kukuřice.

ABA nezávislá dráha regulace exprese stresových genů je realizována specifickými *cis* regulačními sekvencemi DRE – dehydration responsive element (TACCGACAT). Na rozdíl od ABRE, jedna kopie DRE je dostačující pro ABA nezávislou genovou expresi, DRE tedy nevyžaduje žádné jiné elementy. Příkladem může být gen RD29A, který má v promotorové oblasti DRE *cis* element a je indukovatelný suchem a chladem (Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 1994). Podobné *cis* regulační elementy nazývané CRT (C-repeat) a LTRE (low temperature responsive element) s konzervovanou sekvencí A/GCCGAC byly publikovány jako chladem indukované promotorové sekvence. CRT/DRE/LTRE elementy byly nalezeny v promotorech genů indukovaných dehydratací, salinitou a chladem. Exprese *DREB1/CBF* genů je indukována chladem, zatímco exprese *DREB2* genů je indukována suchem a salinitou. *DREB1/CBF* i *DREB2* proteiny vážou DRE, ovšem *DREB1/CBF* působí v chladové odpovědi, zatímco *DREB2* hraje roli při expresi genů za sucha, což naznačuje společnou dráhu exprese genů mezi chladovou odpovědí a reakcí na suchu. *DREB2A* protein obsahuje DNA vazebnou konzervovanou doménu ERF/AP2 a rozeznává DRE sekvence, stejně jako např. *DREB1A*. Sakuma *et al.* (2002) publikovali tři další *DREB1/CBF* podobné geny a šest nových *DREB2* podobných genů, jejichž exprese byla za působení různých stresů nízká. Overexprese *DREB2A* v transgenních rostlinách nevedla ani k retardaci růstu, ani k zesílení tolerance, což naznačuje, že *DREB2A* protein vyžaduje k jeho aktivaci posttranslační modifikaci, zřejmě fosforylaci, ovšem mechanismus této aktivace nebyl do této doby objasněn. Bylo zjištěno, že *DREB2A* bílkovina obsahuje ve své centrální oblasti negativně regulační doménu. Delece tohoto regionu zapříčiňuje konstitutivní expresi aktivní formy. Overexprese této „konstitutivní aktivní“ formy *DREB2A* způsobila retardaci růstu *Arabidopsis* a zároveň významně akcelerovanou toleranci k suchu, ovšem jen velmi mírně zvýšenou chladovou toleranci. Microarray analýza těchto transgenních rostlin ukázala, že *DREB2A* reguluje expresi mnoha dehydratací indukovatelných genů. Nicméně, některé z těchto podřízených genů *DREB2A*, nejsou současně podřízeny *DREB1*, který také rozeznává a váže se na DRE/CRT sekvence, ovšem je funkční při chladové odpovědi. Geny podřízené *DREB2A* hrají důležitou roli ve stresové toleranci při suchu, ovšem zdá se, že samotné nejsou schopny udělit chladovou toleranci (Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 2006).

Recentní práce naznačují (Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 2005; Yamaguchi-Shinozaki *et* Shinozaki, 2006), že existuje další na ABA nezávislá signální dráha v reakci na suchu. Příkladem genu, který není aktivován ani chladem ani po aplikaci ABA, je *ERD1* (early response to dehydration1), který kóduje Clp proteasovou regulační subjednotku ClpD.

*ERD1* není indukován jen suchem, ale je upregulován také během přirozené senescence a tmou indukovaného stárnutí. Analýza promotoru *ERD1* naznačuje, že *cis* regulační elementy zodpovídající za expresi genu během dehydratace a etiolizace jsou v promotorové oblasti lokalizovány zvlášť ve dvou samostatných regionech.

V promotorech dehydrinových genů ječmene lze nalézt od 1 do 3 opakujících se DRE-elementů. CBF/DREB (CRT-Binding Factor/DRE-Binding Factor) transkripční faktory interagují s CRT/DRE elementy a tím regulují transkripční aktivitu dehydrinových genů. V případě suchem indukovaných dehydrinů se na tyto sekvence vážou homology transkripčních faktorů *A. thaliana* DREB2A a DREB2B, které jsou považovány za nejdůležitější geny transkripčních faktorů indukovatelné suchem a zvýšenou koncentrací solí. Při chladu jsou to potom DREB1/CBF (DREB1/CBF1, DREB1A/CBF3, DREB1C/CBF2 ležící v tandemu na 4. chromozomu huseníčku).

Jak již bylo uvedeno výše, CBF geny (C-repeat binding factor), kódující transkripční aktivátory, jsou syntetizovány jako odpověď na nízkou teplotu a sucho a vážou se na CRT/DRE regulační elementy promotorových oblastí genů, čímž tyto geny aktivují. Transkripční aktivátory CBF/DREB1 (CBF1, CBF2, CBF3) jsou syntetizovány jako odpověď na nízkou teplotu. Do genomu papáji melounové (*Carica papaya*) a jí příbuzného druhu *Vasconcella cundinamarcensis* byly vneseny geny CBF1 a CBF3 z *A. thaliana* (Dhekney *et al.*, 2007). Výsledky této práce ukazují, že funkčnost CBF genů v transgenní papáje je podmíněna přítomností mechanismů signalizace chladové aklimatizace a genů zapojených v této signální dráze, které jsou aktivovány jako odezva na CBF proteiny. *C. papaya* na rozdíl od chladově tolerantní *V. cundinamarcensis* postrádá ve svém genomu CBF ortology. Tato odlišnost by mohla být připisována rozdílnému původu a regionu růstu těchto dvou příbuzných rodů. Zatímco areál původu a vývoje *C. papaya* jsou nížiny centrální Ameriky od Mexika po Panamu, rod *Vasconcella* má areál původu a rozšíření v subtropických Andách Jižní Ameriky. Rostlinné druhy z mírného pásu procházejí procesem chladové aklimatizace jako reakce na nízké teploty. Tento fenomén u tropických rostlin chybí, proto genom *C. papaya* neobsahuje žádné transkripční aktivátory odpovědné za chladovou aklimatizaci (CBF).

Příkladem přenosu CBF genu je *Osmyb4*, který je indukovaný chladem a byl izolován z rýže (*Oryza sativa*). Gen *Osmyb4* kóduje transkripční faktor Myb4. Exprese *Osmyb4* je v rýži indukována pouze chladem, nikoli jinými abiotickými stresory, a ani kyselinou abscisovou (ABA), což naznačuje, že jeho funkce je specificky spojená s ABA-independentní chladovou odpovědí. Overexprese genu *Osmyb4* pod transkripční kontrolou promotoru CaMV 35S v *A. thaliana* silně zvyšovala chladovou a mrazovou toleranci rostlin. U *Osmyb4*

transformantů byla ovlivněna exprese genů, které se účastní v různých chladem indukovaných drahách, což naznačuje, že Myb4 funguje jako důležitý spínač v chladové toleranci rostlin (Vannini *et al.*, 2004). V jiné práci (Mattana *et al.*, 2005) je popisována akumulace volných cukrů ve formě glukosy a sacharosy (ty mohou být následně využity jako rychlý zdroj energie při respiraci), glycin betainu (výsledkem i poměrně nízké akumulace tohoto kompatibilního solutu je indukce chladové a mrazové tolerance a tolerance k suchu) a prolinu. Microarray analýza transformovaných a netransformovaných huseníčků prokázala, že overexprese *Osmyb4* pozitivně ovlivnila expresi více než 250 genů, z nichž velká většina kódovala transkripční faktory. Na 60 % promotorů těchto transkripčních faktorů se nemůže Myb4 vázat, což indikuje fakt, že některé geny může Myb4 ovlivňovat nepřímo. *In silico* analýza promotorů jiných genů však naznačuje možnost přímé aktivace těchto genů, např. gen *P5CS1* kódující enzym katalyzující biosyntézu prolinu obsahuje v promotorové oblasti více vazebných míst pro Myb4.

Cheng *et al.* (2009) izolovali a následně charakterizovali gen *GMCHI* ze sóje (*Glycine max*). Analýzou nukleotidové sekvence, která předchází TA-boxu, byly nalezeny MYB a MYC vazebné elementy a tři boxy, které sdílejí vysokou sekvenční homologii s konzervovanými boxy *DREB1* rodiny. Je známo, že tyto speciální konzervované boxy v promotorech obsahuje jen rodina *DREB1*. *GMCHI* je tedy pravděpodobně členem *DREB1* rodiny a mohl by fungovat jako regulátor genů indukovaných abiotickými stresy. Gen *GMCHI* byl přenesen do *A. thaliana* (*35S::GMCHI*) a bylo hodnoceno procento přežití WT (wild type) a *35S::GMCHI* rostlin po jejich vystavení nízkým teplotám (4 °C, 2 dny a následně -18 °C, 14 hod). Overexprese *GMCHI* v *A. thaliana* jednoznačně zvýšila procento přežití rostlin, nicméně nebyly zaznamenány difference mezi mrazovou tolerancí u WT a *35S::GMCHI* rostlin, které nepředcházela chladová aklimatizace. To nasvědčuje tomu, že gen *GMCHI* není pravděpodobně sám o sobě dostačujícím faktorem k udělení mrazové tolerance a zřejmě tedy spolupracuje s jinými faktory během chladové aklimatizace.

Proteiny typu C2H2 s motivem zinkového prstu byly identifikovány v řadě rostlinných druhů. Například protein SCOF-1 (*SCOF-1* byl izolovaný ze sóje) je pozitivní regulátor exprese COR genů, a zvyšuje chladovou toleranci transgenních rostlin (Kim *et al.*, 2001). Huang *et al.* (2009) publikovali transgenní rýži (*Oryza sativa* sub. *Japonica*) s overexprimovaným genem *ZFP245* kódující C2H2 typ proteinu s motivem zinkového prstu. Protein *ZFP245* má transaktivační aktivitu a jeho subcelulární lokalizace byla určena za pomoci konfokální mikroskopie v nukleární oblasti. Zatímco nízké teploty (4 °C, 4 dny) přežilo jen 20 % netransformovaných rostlin, transformantů přečkalo 80 %. Z dalších



výsledků je patrné, že ZFP245 působí u rýže jako pozitivní regulátor exprese genů mající spojitost s akumulací prolinu – *OsP5CS* (kódující pyrrolin-5-karboxylátsyntetázu) a *OsProT* (kódující prolinový transportér) a genů antioxidantního systému – SOD (superoxid dismutasa) a POD (peroxidasa), které se uplatňují jako důležité enzymy při detoxikaci ROS. *ZFP245* rostliny byly hypersenzitivní k exogenně aplikované ABA, proto můžeme předpokládat, že tento gen je zapojen do ABA transdukční signální dráhy během stresové odpovědi.

### **1.11.2 LEA proteiny a dehydriny**

Největší skupinou ochranných proteinů indukovaných stresem spojeným s dehydratací pletiv jsou proteiny skupiny LEA (Late Embryogenesis Abundant), které jsou členěny na pět skupin: LEA-D19 (skupina I), LEA-D11 (skupina II, též označována jako dehydriny), LEA-D7 (skupina III), LEA-D113 (skupina IV) a LEA-D95 (skupina V). Skupina proteinů LEA-D19 postrádá ve svých řetězcích cystein a tryptofan. Proteiny této skupiny vážou vodu, a proto jsou mnohem více hydratovány, než většina ostatních globulárních polypeptidů, čímž vytváří v buňce ochranné vodní prostředí (Bray, 1995).

Mezi LEA proteiny patří i dehydriny (DHNs), které se primárně akumulují u rostlin za optimálních fyziologických podmínek v pozdní fázi embryogeneze (dozrávání semen) a v malém množství také v mladých částech rostlin při rychlém buněčném dělení nebo buněčném prodlužování, např. v kořenové špičce. Sekundárně se tyto proteiny akumulují jako odezva na exogenní aplikaci ABA (geny skupiny D11 jsou regulovány ABA), nízkou teplotu (chlad, mráz) nebo jiný environmentální stres spojený s dehydratací buněk, jako je sucho a tvorba extracelulárních krystalů ledu nebo salinita (Close, 1996), ale také se stresem biotickým asociovaným se ztrátou vody z buněk a poraněním (v tomto případě hraje důležitou úlohu signál kyseliny jasmonové) (Kosová *et al.*, 2011a).

Pojem dehydriny byl zaveden v roce 1989 pro dehydratací indukované proteiny (dehydration-induced proteins). Dnes je tento termín používán pro takové proteiny, které mají specifickou sekvenční homologii. Prvními klonovanými a charakterizovanými dehydrinovými geny byly *RAB21* (Mundy *et Chua*, 1988) z rýže a *D-11* pocházející z bavlíku (Baker *et al.*, 1988).

### **1.11.3 Dehydriny – jejich topochemie**

Dehydriny patří do rodiny LEA-D11 proteinů, které hrají významnou protektivní roli při dehydrataci buněk u rostlin (Svensson *et al.*, 2002; Suprunova *et al.*, 2004). Mnoho příkladových studií transgenních událostí poskytuje přesvědčivé důkazy o tom, že dehydriny

hrají významnou roli v aklimatizačních procesech rostlin a přispívají k jejich toleranci zřejmě jako důležité stabilizátory buněčných struktur (Škodáček *et al.*, 2010a) a inhibitory koagulace makromolekul čímž napomáhají udržovat integritu buněk (Close, 1997). Dosud nebyla prokázána katalytická funkce těchto bílkovin (Beck *et al.*, 2007). Dehydrinové proteiny se nacházejí převážně v blízkosti plazmatické membrány a podílejí na stabilizaci buněčných struktur při stresu asociovaném s dehydratací buněk a mají tedy funkci chaperonů (specifické interakce) nebo spíše molekulárních štítů (nespecifické protein-protein interakce). Příkladem lokalizace proteinů kolem plazmalemy může být práce Houde *et al.* (2004), ve které byla zesílena chladová tolerance rostlin vnesením dehydrinového genu *Wcor410* (Wheat Cold Regulated Protein) do genomu jahodníku (*Fragaria × anassassa*, cv. Chambly). Molekulární analýza genu *Wcor410*, který byl izolován z pšenice seté (*Triticum aestivum*), odhalila, že gen náleží do multigenové rodiny, kódující proteiny dehydrinů, které se akumulují ve velmi vysokých koncentracích v blízkosti plazmatické membrány ve vaskulární transitní zóně u chladově aklimatizovaných buněk. Vlastnosti, abundance a lokalizace periferního proteinu WCOR410 nasvědčují faktu, že tento protein má kryoprotektivní funkci a hraje významnou roli při prevenci destabilizace plazmatické membrány během procesu dehydratace asociovaného s mrazovým působením a mohl by být determinujícím faktorem zvýšené buněčné rezistence k mrazu.

Recentní studie ovšem dokazují, že distribuce dehydrinů není omezena jen na okolí plazmatické membrány, ale že tyto bílkoviny mohou být akumulovány i v jádře, jako například pšeničný dehydrin WCS120 (Houde *et al.*, 1995). Dalším přesvědčivým důkazem různorodosti lokalizace dehydrinů je práce Hara *et al.* (2003) s transformanty tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) dehydrinovým genem *CuCOR19* z mandarinky unšiu (*Citrus unshiu*). Lokalizace převážné většiny proteinu CuCOR19 v transformantech byla v mitochondriích. Mitochondrie jsou generátory radikálů, ve kterých elektrony z respiračních řetězců reagují s O<sub>2</sub> na O<sub>2</sub><sup>-</sup> a hrozí riziko pronikání volných radikálů do cytosolu, kde mohou atakovat buněčné membránové systémy. Výsledky této studie ukazují, že protein CuCOR19 eliminoval volné radikály tvořené v mitochondriích (protein byl detekován i v cytosolu), což naznačuje, že tento dehydrin je potenciálním antioxidantem chránící membránové systémy buňky a tím napomáhá chladové aklimatizaci rostlin. Navíc semena tabáku s genem *CuCOR19* dříve klíčila a semenáčky exponované nízkým teplotám rostly lépe než kontrolní varianta. Distribuce dehydrinových proteinů v buňce je značně variabilní, nicméně do dnešní doby nebyla prokázána přítomnost těchto bílkovin v buněčné stěně (Kosová *et al.*, 2011a).

#### **1.11.4 Dehydriny – jejich morfologie a klasifikace**

Většinou je působení abiotických stresů spojeno s nedostatkem vody v buňce (Atienza *et al.*, 2004), a proto akumulace dehydrinových proteinů velmi často koreluje s odolností rostliny k stresovým podmínkám, resp. suchu a proto by mohly být významnými aplikovatelnými markery suchovzdornosti rostlin. Dehydriny obsahují jednu či více konzervovaných domén bohatých na lyzin s  $\alpha$  helix strukturou. Jedná se o obligátní K segment blízko C terminálního konce, na který se vážou polyklonální protilátky, které se využívají při detekci dehydrinů (Close *et al.*, 1993). K segment (EKKGIMDKIKEKLPG) je jedinou vždy přítomnou konzervovanou doménou, skládající se z 15. aminokyselinových zbytků a v dehydrinech se vyskytuje od 1 do 11 kopií (Choi *et al.*, 1999). Dalšími již fakultativními doménami jsou S- a Y- segmenty. S-segment obsahuje rezidua serinu, která mohou být rozpoznávána a fosforylována kasein kinasou II (CK<sub>2</sub>)-typ kinasy (Svensson *et al.*, 2002). Zdá se, že fosforylace S-segmentu může napomáhat interakci dehydrinu se specifickým signálním peptidem vyúsťující jejich translokaci z cytoplazmy do jádra. Kosová *et al.* (2010) uvádí, že za stresových podmínek jsou pro dehydriny typické dvě posttranslační modifikace – O-glykosylace a fosforylace. Zatímco funkce fosforylace byla vysvětlena výše, zdá se, že glykosylované dehydriny nemají žádnou specifickou úlohu.

Celá řada dehydrinů nese na svém N terminálním konci další konzervovanou sekvenci typickou pro tyto proteiny, tzv. Y-segment bohatý na tyrosin. Tento motiv sdílí významnou homologii s nukleotidy vázajícím místem rostlinných a bakteriálních chaperonů. Kromě těchto tří konzervovaných sekvencí, mohou dehydriny obsahovat také méně konzervované regiony bohaté na glycin a polární aminokyseliny, zvláště na treonin. Tato doména se nazývá  $\phi$ -segment a v některých případech může být lokalizována mezi K-segmenty (Allagunova *et al.*, 2003).

Dehydrinové proteiny nesdílejí sekvenční podobnost s žádnými jinými enzymy či obecně proteiny se známou funkcí a zároveň vykazují značný velikostní polymorfismus (od 82 do 648 aminokyselinových zbytků) (Svensson *et al.*, 2002) s molekulovou hmotností od 9 do 200 kDa (Allagunova *et al.*, 2003). Struktura a velikost dehydrinových molekul je tedy determinována kombinací počtu K-, S-, Y- a  $\phi$ - segmentů. Akumulace dehydrinů může dosahovat vysokého množství tvořící 1 – 5 % obsahu rozpustných proteinů (Close, 1996).

Důležitou vlastností dehydrinů je jejich rozpustnost po varu (jsou termostabilní), čehož se využívá při jejich extrakci a získávání dehydriny bohaté frakce. Obecně dehydriny obsahují velké množství glycinu a lyzinu, naopak téměř chybí cystein a tryptofan. Tím je vysvětlována vysoká hydrofilita těchto proteinů (Campbell *et al.*, 1997).

Dehydriny jsou podle práce Close (1996) členěny dle přítomnosti výše popsaných vysoce konzervovaných segmentů a jejich kombinací na pět tříd:  $Y_nSK_2$ ,  $K_n$ ,  $K_nS$ ,  $SK_n$  a  $Y_2K_n$ .

Třída  $Y_nSK_2$  dehydrinů je nejvíce abundantní skupinou. Dehydriny zařazené v této třídě obsahují od jednoho do tří Y-segmentů, jeden S-segment a dva K-segmenty. Jedná se o neutrální nebo bazické proteiny. Jsou indukovány suchem nebo ABA, nikoli pak chladem. Dehydriny ječmene DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6 a DHN9 sdílí obecnou strukturu YSK2 a jsou akumulovány u klíčících rostlin jako odpověď na ABA a dehydrataci, nicméně jejich obsah zůstává nezměněn při hypotermickém stavu. Do této třídy je řazen i dehydrin ječmene DHN12. Gen *Dhn12* je specificky exprimován během embryonální fáze vývoje.

$K_n$  skupina dehydrinů obsahuje od dvou do devíti K-segmentů. Tyto kyselé nebo neutrální proteiny jsou indukovány chladem, suchem a ABA. Příkladem může být gen ječmene *Dhn5B* (typ  $K_9$ ), který je indukován hlavně nízkými teplotami, méně pak suchem a ABA.

$SK_n$  třída je charakteristická jedním S-segmentem a dvěma nebo třemi K-segmenty. Jsou to kyselé proteiny preferenčně indukované nízkými teplotami. Typickým zástupcem je pšeničný protein WCOR410, jehož obsah je signifikantně vyšší v ozimých odrůdách pšenice než v odrůdách jarních. Dehydrin DHN8, který je homolog WCOR410 v ječmeni, je opět indukován hlavně nízkými teplotami, v porovnání s dehydriny třídy  $Y_nSK_2$  pak méně během sucha a ABA.

$K_nS$  třída je zvláštní tím, že oproti ostatním dehydrinům začíná K-motiv jinou sekvencí aminokyselin - (H/Q)KEG. Zástupcem je například Wsi724 z rýže, který je indukován chladem a suchem.

Poslední skupinou jsou  $Y_2K_n$  dehydriny, které obvykle obsahují Y-segment a jeden nebo dva K-segmenty. Příkladem je DHN1 dehydrin z vigny, který je asociován s chladovou tolerancí semen během jejich klíčení.

Některé dehydriny nelze zařadit do žádné z výše uvedených tříd, jako například protein H26 z ptačince, který má  $SK_3S$  strukturu a pravděpodobně reprezentuje přechodnou formu  $SK_n$  a  $K_nS$  proteinů.

Do dnešního dne byly publikovány stovky dehydrinových proteinů napříč rostlinnou říší (vyšší rostliny – jednoděložné, dvouděložné, nahosemenné rostliny, mechorosty, kapradiny, řasy, lišejníky). Homology dehydrinů byly objeveny také v houbách (*Pneumocystis carinii*) v buňkách bakterií *Escherichia coli* a dokonce i u bezobratlých, kteří mohou přežít buněčnou desikaci v anhydrobiotickém stavu, jako například hlístice

*Caenorhabditis elegans* (Kosová *et al.*, 2011a). Zajímavostí je, že k proteinům, které se vzdáleně podobají dehydrinům patří díky přítomnosti sekvenčního motivu, který může utvářet amfipatický  $\alpha$  helix analogní K-segmentu dehydrinů i  $\alpha$ -synucleins. Tento protein byl nalezen v živočišných neuronech, které se vážou k vezikulům s neurotransmitery (Souza *et al.*, 2000).

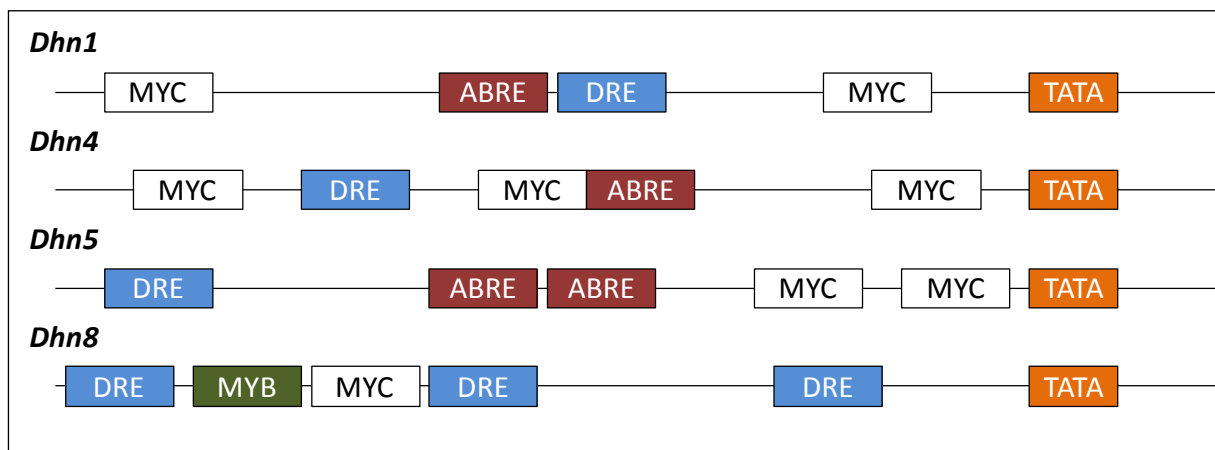
### **1.11.5 Dehydriny ječmene**

Do dnešní doby bylo v genomu ječmene identifikováno 13 dehydrinových genů. Tyto geny leží na 4 chromozomech – 3H, 4H, 5H a 6H (Choi *et al.*, 1999). Odhaduje se, že hexaploidní pšenice, která obsahuje tři homologní *Triticeae* genomy má 33-39 *Dhn* genů (Choi *et al.*, 1999). Práce Close *et al.* (1999), řadí mezi suchem indukované dehydriny následující dehydrinové proteiny: DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6, DHN7, DHN9, DHN10 a DHN11. Choi *et al.* (1999) analyzovali expresní charakteristiky 11 dehydrinových genů ječmene odrůdy Dicktoo (v té době bylo známo jen 11 *Dhn* genů, nicméně statistická analýza predikovala dnešních 13 *Dhn* genů) při stresu suchem, chladem a ošetření ABA. Výsledkem bylo, že exprese dehydrinových genů byla diferencially regulována při těchto různých stresech. Práce Choi *et al.* (1999) stavěla na všeobecně přijímaných faktech, že všechny *Dhn* geny kódující proteiny třídy YSK<sub>2</sub>, tj. *Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn6*, *Dhn7* a *Dhn9* jsou up-regulovány dehydratací a ABA, ovšem nikoli chladem. Zajímavé je, že všechny proteiny těchto genů mají vysokou hodnotu izoelektrického bodu (pI). Dalším faktem bylo, že exprese genů *Dhn5* a *Dhn8* (tento gen je jako jediný exprimován i za normálních podmínek) je naopak zvýšena při působení nízké teploty a proteiny DHN5 a DHN8 mají poměrně nízké pI v kyselé oblasti. Výsledky práce ovšem ukázaly, že *Dhn5* byl up-regulován chladovým působením, dehydratací a ABA ošetřením. Pšeničným ortologem *Dhn5*, který je považován za hlavní chladově indukovaný *Dhn* gen v ječmeni, je gen *wcs120*, který kóduje hlavní chladově indukovaný protein WCS120 v pšenici. Další výsledky ukázaly, že *Dhn8* byl exprimován i za normálních podmínek (spolu s *Dhn11*), up-regulován za chladu a ABA a down-regulován při působení sucha. Exprese *Dhn10* byla indukována za dehydratace, nikoli pak za chladu a velmi slabě (jestliže vůbec) ABA.

Jak již bylo zmíněno, promotory *Dhn* genů obsahují typické regulační *cis* elementy související se suchem, ABA a chladovou odpovědí buňky, respektive celé rostliny. Choi *et al.* (1999) identifikovali tyto sekvence v promotorech *Dhn* genů ječmene. Všechny promotory *Dhn* genů kódující proteiny třídy YSK<sub>2</sub> a *Dhn5*, *Dhn6* a *Dhn11* obsahují jeden nebo více ABRE a DRE elementů. Exprese těchto dehydrinů je up-regulována jak dehydratací, tak i ošetřením ABA. Navíc tyto geny obsahují MYC elementy (kromě *Dhn7*), které spolu s MYB

elementy sehrávají úlohu v indukci exprese genu *Rd22* v *Arabidopsis*, který je aktivován chladem a suchem (Abe *et al.*, 1997).

Obrázek č. 4: Schematické znázornění cis regulačních elementů (DRE, ABRE, MYC A MYB) v promotorech čtyř Dhn genů v ječmeni – *Dhn1*, *Dhn4*, *Dhn5* a *Dhn8*. Upraveno podle Choi *et al.* (1999)



Tommasini *et al.* (2008) publikovali jinou rozsáhlou transkriptomickou práci, ve které studovali vliv sucha a chladu na expresi genů odrůdy ječmene Morex. Tito autoři rozdělili dehydrinové geny na základě jejich podobného expresního profilu metodou hierarchické klastrové analýzy na tři skupiny. Hlavní skupinu tvořily dehydriny, jejichž geny byly up-regulovány suchem (nikoli chladem) – *Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn7*, *Dhn9* a *Dhn10* a za normálních fyziologických podmínek jsou exprimovány v koleoptile, embryu, mezokotylu a v kořínku semene. Tato skupina zahrnuje všechny nízkomolekulární dehydriny a některé bazické dehydrinů typu YSK<sub>2</sub>. Zajímavé je, že geny *Dhn1*, *Dhn2* a *Dhn9* lemují *Vrn-1H* lokus na chromozomu 5H (Choi *et al.*, 1999). Nicméně práce Tommasini *et al.* (2008) ukázala, že *Dhn1* a *Dhn2* nebyly indukovány chladem ani mrazem a následným roztáním, zatímco *Vrn-1H* byl indukován v souladu s rolí, kterou tento gen sehrává v odpovědi na nízkou teplotu.

Tabulka č. 1: Specifikace dehydrinových proteinů ječmene

Dehydrin	Třída DHN	Počet AMK	pI (pH)	Molekulová hmotnost (kDa)	Citace
<i>Dhn1</i>	YSK <sub>2</sub>	139	8,81	14,20	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn2</i>	YSK <sub>2</sub>	141	8,81	14,40	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn3</i>	YSK <sub>2</sub>	155	8,07	15,70	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn4</i>	YSK <sub>2</sub>	205	8,04	20,70	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn5</i>	K <sub>9</sub>	575	6,65	58,50	Close <i>et al.</i> (1995)
<i>Dhn6</i>	YSK <sub>3</sub>	486	8,80	46,15	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn7</i>	YSK <sub>2</sub>	181	9,10	18,10	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn8</i>	SK <sub>3</sub>	255	5,21	27,70	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn9</i>	YSK <sub>2</sub>	146	9,52	15,10	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn10</i>	YSK <sub>3</sub>	295	9,67	29,15	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn11</i>	Y <sub>2</sub> SK <sub>2</sub>	232	6,26	23,50	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Dhn12</i>	YSK <sub>2</sub>	141	6,59	14,20	Choi <i>et</i> Close (2000)
<i>Dhn13</i>	KS	107	6,84	12,00	Rodriguez <i>et al.</i> (2005)

Druhá skupina zahrnovala geny *Dhn5*, *Dhn8* a *Dhn13*, které byly indukovány jak suchem, tak i nízkou teplotou. Autoři práce naznačují, že díky této vlastnosti by tyto dehydriny mohly napomáhat aklimatizaci buněk, respektive rostlin při intenzivním působení stresů. Nicméně práce Zhu *et al.* (2000) ukázala, že *Dhn5* a *Dhn8* byly syntetizovány jako odpověď jen na nízkou teplotu. Podobně i pšeničné ortology *Dhn5* a *Dhn8* byly akumulovány ve vaskulární transitní zóně meristému odnožovacích uzlů chladově aklimatizovaných rostlin, což naznačuje, že sehrávají úlohu v ochraně citlivých pletiv během mrazu (Houde *et al.*, 1995).

Třetí skupinou tvořily *Dhn6*, *Dhn11* a *Dhn12*, které nebyly indukovány ani nízkou teplotou ani suchem a byly exprimovány hlavně v embryu a v obilce.

Práce Škodáček *et al.* (2010b) a Škodáček *et* Prášil (2011a) popisují zvýšenou akumulaci dehydrinových proteinů při stresu suchem u různých odrůd ječmene (*Hordeum vulgare*). Na základě výzkumů Škodáček *et al.* (2010b) a Škodáček *et* Prášil (2011a) je možné přiklonit se k faktu, že i regulace exprese dehydrinu s nevyšší molekulovou hmotností DHN5 (58,5 kDa), kódovaný genem *Dhn5* lokalizovaným na chromozomu 6H, jenž je popisován

hlavně jako chladově indukovaný dehydrin, je zvýšena při stresu suchem. Expres DHN5 je tedy zřejmě obecně asociována s dehydratací buněk. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky Brini *et al.* (2007), v jejichž práci byly publikovány rostliny *Arabidopsis* s overexprimovaným DHN5, které byly tolerantnější ke stresu suchem ve srovnání s netransgenními rostlinami.

Labadidi *et al.* (2004) sledovali variabilitu alel *Dhn* genů ve 14. vybraných genotypech ječmene (včetně odrůdy Tadmor, kterou byla objektem testování i v této práci). Produkty polymerázové řetězové reakce (PCR) genů *Dhn1* a *Dhn4* poskytly 4 různé amplifikační fragmenty, což odráží přítomnost 4 různých alel *Dhn1* a *Dhn4* přítomných v souboru analyzovaných genotypů ječmene. Geny *Dhn3*, *Dhn5*, *Dhn7* a *Dhn9* vykazovaly přítomnost dvou polymorfních alel každého genu a testované genotypy nesly jen jednu strukturní variantu genů *Dhn6* a *Dhn10*. Close *et al.* (2000) publikoval alelickou variabilitu *Dhn4*, který kóduje protein DHN4, jenž tito autoři považují za nejvíce abundantní DHN protein v embryu zralého semene a v suchem stresovaném pletivu rostlin ječmene. Práce přinesla výsledky, které prezentují přítomnost tří typů alelické variability *Dhn4*; dvě se manifestují na proteinové úrovni a jeden v intronu. Na proteinové úrovni se tato variabilita demonstruje přítomností různého počtu  $\phi$  segmentů mezi  $K_1$  a  $K_2$  doménou.

### **1.11.6 Aquaporiny**

Hydrofobní povaha fosfolipidové dvouvrstvy membrán zabraňuje volnému pohybu molekul vody do buňky a mezi vnitrobuněčnými kompartmenty. Aquaporiny (AQPs) usnadňují a regulují transport molekul vody přes membrány, patří do rodiny vysoce konzervovaných membránových (kanálových) proteinů nazvaných MIP (major intrinsic protein). Tonoplastové AQPs (tonoplast intrinsic protein – TIPs) zřejmě zvyšují hydraulickou permeabilitu tonoplastu, což podporuje vstup vody do vakuoly a s tím spojené rychlé zvětšování buněk. Jeden z prvních MIPs TIPs proteinů s AQP funkcí u rostlin byl identifikován v membráně vakuoly *A. thaliana* a pojmenován AtTIP1;1. Peng *et al.* (2007) overexprimovali gen *PgTIP1* z ženšenu (*Panax ginseng*) kódující AQP sub-rodiny TIPs (AQPs jsou rozděleny podle sekvenční homologie na 5 sub-rodin) v *A. thaliana* (*PgTIP1-OXP*). Determinace expresního profilu nativního  $\gamma$ -TIP AQP (*AtTIP1;1*) a dvou *COR* genů *COR15A* a *RD29A* (na jejichž regulační elementy se váží transkripční aktivátory CBF/DREB) u WT rostlin, potvrdila již známý fakt, že během chladové aklimatizace/chladového stresu jsou *COR* geny indukovány (a během chladové deaklimatizace downregulovány). Naproti tomu gen *AtTIP1;1* je downregulován během chladové aklimatizace a během chladové deaklimatizace je obnovena původní hladina exprese. Navíc nebyly pozorovány rozdíly mezi



stupněm exprese obou sledovaných *COR* genů u WT a *PgTIP1*-OXE rostlin, což nasvědčuje faktu, že oslabená schopnost chladové aklimatizace *PgTIP1*-OXE rostlin není asociovaná s pozměněnou expresí *COR* genů a pravděpodobně byla přímým nebo nepřímým důsledkem overexprese *PgTIP1*, který, jak se zdá, signifikantně působí při odpovědi rostliny na stres chladem, suchem a zasolením. Zdá se, že fosforylace AQP může vyvolat zvýšenou permeabilitu plazmatické membrány pro vodu. Příkladem může být AQP  $\alpha$ -TIP a výzkumy fosforylace jeho homologu v oocytech žáby *Xenopus*. Jiným příkladem aquaporinu, který je lokalizován v plazmatické membráně *Arabidopsis* je RD28, jehož gen *Rd28* je velice rychle indukován, zaznamená-li rostlina vodní deficit (Sharma *et al.*, 2010). Jiným příkladem změny exprese genů zapojených v příjmu vody, iontů a transportních procesech byl publikován v práci Tommasini *et al.* (2008), kde byla popsána modifikace exprese pro gen *CorA* like  $Mg^{2+}$  transportér.

### 1.11.7 Kyselina abscisová

Adaptační mechanismus zásadně ovlivňuje schopnost přizpůsobit se neustálým změnám vnějšího prostředí během celého života rostlin. Jeden ze základních regulačních mechanismů, který umožňuje rostlinám citlivě reagovat na změny prostředí, tvoří reakce řízené fytohormony.

Kyselina abscisová (ABA) reguluje různé vývojové a fyziologické procesy, jako např. dozrávání semen, desikaci, dormanci a klíčení. ABA dále působí jako mediátor adaptivní odpovědi na abiotické environmentální stresy, jako jsou sucho a nízká teplota. ABA je jedním z mnoha seskviterpenoidů přítomných v rostlinách, které jsou jako skupina odvozeny z kyseliny mevalonové. K přeměně přes izoprenoidy (je složena ze tří izoprenoidních jednotek) dochází většinou v cytosolu listů (Gupta, 2005).

Hlavní fyziologické účinky ABA jsou inhibice prodlužovacího růstu, stimulace opadu listů, urychlení stárnutí, regulace dormance a regulace vodního režimu rostlin. Při nedostatku vody vyvolá uzavření průduchů a mimo to zvýší hydraulickou vodivost kořenů (Gloser *et al.*, 1998). Nejvíce ABA se tvoří v dormantních orgánech, ale i v mladých, rychle rostoucích pletivech. Tvoří se v buňkách obsahujících chloroplasty či amyloplasty tj. v zelených částech rostlin, ale i v kořenových špičkách. ABA dokáží syntetizovat také houby. V rostlině ABA působí i ve velice nízkých koncentracích a může být v rostlinném těle transportována. ABA je řazena mezi fytohormony. Fytohormony neboli endogenní růstové regulátory, jsou účinné ve velmi nízkých koncentracích. Každý z fytohormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů a naopak, týž proces bývá ovlivněn větším počtem různých

látek. Fytohormony jsou účinné pouze ve vazbě s receptorem, látkou bílkovinné povahy (Macháčková, 1998). Možné receptory ABA popisuje např. Škodáček *et al.* (2011b).

Obsah endogenní ABA se dynamicky mění v závislosti na syntéze, redistribuci, přechodu do inaktivní formy (Sauter *et al.*, 2002) či degradaci ABA. ABA ovlivňuje expresi mnoha genů.

Wan *et al.* (2008) zveřejnili výsledky experimentu, kdy uvedli, že působení sucha rychle zvýšilo polymerizaci AtBG1 proteinu, což mělo za následek více než čtyřnásobný nárůst jeho enzymatické aktivity. Z toho vyvozují, že při výskytu sucha může AtBG1 sloužit jako molekulární přepínač k uvolnění bioaktivní ABA z ABA-GE transportované ze zásobních vakuol a to zatím neznámým mechanismem. Po uměle zvýšené expresi NCED (9-cis-epoxykarotenoid dioxygenasy) v transgenních rostlinách došlo ke zvýšení hladiny ABA, nárůstu dormance semen, snížení rychlosti transpirace a nárůstu tolerance k suchu což podporuje myšlenku, že štěpící reakce je hlavním krokem kontrolujícím biosyntézu ABA v zelených pletivech (Wan *et al.*, 2008). V souladu s předešlou prací byla u rostlin ječmene detekována zvýšená exprese genu kódující NCED při stresu suchem (Tommasini *et al.*, 2008).

Tähtiharju *et Palva* (2001) studovali roli genu *AtPP2CA* (z *A. thaliana*), kódující proteinfosfatasu 2C (*AtPP2CA*), při chladové aklimatizaci rostlin a vytvořili transgenní *AtPP2C* antisense rostliny huseníčku. *AtPP2CA* je indukován nízkou teplotou, suchem, zvýšenou koncentrací solí a ABA. Bylo zjištěno, že *AtPP2CA* blokuje geny indukované i reprimované ABA a funguje tedy jako negativní regulátor v ABA signalizaci. Výsledky výše uvedených autorů indikují fakt, že *AtPP2CA* je integrální součástí transdukce signálu za nízkých teplot a kontroluje citlivost rostlin k ABA při chladové aklimatizaci. Inhibice exprese *AtPP2CA* v antisense rostlinách akcelerovala chladovou aklimatizaci a vedla k vyšší mrazové toleranci. Toto zvýšení tolerance dobře korelovalo s transientně vyšší endogenní hladinou ABA. Zesílení mrazové tolerance bylo dosaženo také při exogenní aplikaci ABA. Obecně tyto výsledky naznačují, že antisense rostliny byly senzitivnější k ABA ve srovnání s WT rostlinami. Zvýšený stupeň chladové aklimatizace je tedy snadno vysvětlitelný vystupňovanou citlivostí k ABA u transformantů a nasvědčuje faktu, že *AtPP2CA* působí jako negativní regulátor některých chladem a ABA indukovaných genů a v důsledku tedy funguje jako negativní regulátor chladové aklimatizace. Je tedy možné se domnívat, že *AtPP2CA* je součástí na CBF/DREB nezávislé signální dráhy, modulující expresi chladem a ABA iniciovaných genů a tedy, že modifikacemi jednotlivých komponent signálních drah jiných než transkripčních aktivátorů lze zvyšovat toleranci rostlin k chladu a suchu.

Cílem práce Asghari *et Ebrahimzadeh* (2002) bylo zjistit, zda je ABA indukovaná tolerance k suchu ve vztahu ke změně obsahu proteinů ovlivňujících fotosyntézu. Data naznačila, že stres suchem i aplikace ABA zvyšují při fotosyntéze expresi Rubisco aktivasy.

Jednou z možností sledování vztahu ABA a proteinů je studium působení konkrétního abiotického stresu a aplikace ABA. Tak byl nalezen například protein AtTSPO (*Arabidopsis thaliana* TSPO-related). Tento protein je vázán na membráně, nejčastěji je zjištěn v suchých semenech, ale také během vegetativní fáze růstu při osmotickém stresu či zasolení anebo v důsledku působení kyseliny abscisové. AtTSPO protein může být detekován v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu rostlinné buňky (v epidermis listu). Má se za to, že je indukován abiotickým stresem a ve vztahu ke kyselině abscisové je zapojen do krátkodobého vnitrobuněčného vnímání stresu (Guillaumot *et al.*, 2009).

Vaseva *et al.* (2010) analyzovali rostliny pšenice ozimé s různou reaktivitou na suchu z nádobových pokusů, které byly ve stáří osmi dnů (u rostlin byl plně vyvinut první a rozvíjející se druhý list) vystaveny stresu sucha a to až po dobu devíti dnů. Vaseva *et al.* (2010) uvádějí, že vyšší obsah ABA v listech nestresovaných mladých rostlin pšenice je ve vztahu k dřívější expresi základních LEA II a LEA III proteinů jako část adaptační reakce na postupující stres suchem. ABA upreguluje expresi LEA proteinů, proteáz, chaperoninů, iontů a vodních kanálků, antioxidantních enzymů a enzymů souvisejících s metabolismem kompatibilních rozpuštěných látek (Vaňková, 2010).

### **1.11.8 Oxidativní stres a s ním asociované transdukční signální dráhy**

Sucho, chlad a salinita indukují akumulaci aktivních forem kyslíku (souhrnně označované jako ROS – reactive oxygen species), zahrnující například superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál, jsou vytvářeny jako vedlejší produkty při normálním buněčném metabolismu. Jejich zvýšená produkce je spojena s různými environmentálními stresy, hlavně suchem, chladem, salinitou a také ABA. Zatímco akumulace vysokého množství H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vede k programované buněčné smrti, jeho relativně malá koncentrace moduluje genovou expresi vyúsťující v zesílenou odpověď rostlin na působící stres. Peroxid vodíku aktivuje fosfokinasu kinasu kinasu (MAPKKK – mitogen-activated protein kinase kinase kinase), která je první kinasou v MAP kinasové signální kaskádě, přenášející signál z plazmatické membrány do jádra jako odezvu na řadu stimulů. MAPKKK fosforyluje fosfokinasu kinasu (MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase), která fosforylací aktivuje fosfokinasu (MAPK – mitogen-activated protein kinase). MAPK se po fosforylaci přemístí do jádra, kde může fosforylovat a aktivovat transkripční faktory. Protože je

transdukční signální dráha aktivace MAPK peroxidem vodíku konzervovaná (vývojově zachovaná) u všech eukaryot, Shou *et al.* (2004) předpokládali, že konstitutivní exprese tabákového genu *NPK1* (*ANP1/2/3* – ortolog v *A. thaliana*), kódující MAPKKK, v kukuřici (*Zea mays*) může zvýšit její toleranci k abiotickým stresům. Transgenní rostliny měly zvýšenou hladinu cukrů, což značí, že *NPK1* pravděpodobně indukuje některé biochemické procesy, které zvyšují obsah cukrů. V souladu s předešlými studiemi rostliny ječmene za sucha nebo chladu aktivují expresi MAPK (Tommasini *et al.*, 2008).

Jak již bylo uvedeno výše, protein kinasy dovedou kontrolovat expresi mnoha cílových genů a transkripčních faktorů aktivací transdukčních signálních kaskád. Nukleosiddifosfát kinasy (NDPKs) jsou všudypřítomné provozní (housekeeping) enzymy, které udržují intracelulární hladinu všech nukleosidtrifosfátů (NTP) s výjimkou adenosintrifosfátu (ATP). NDPKs se dále účastní např. při auxinové odpovědi a stresově oxidativní (a UV-B) signalizaci. Byly publikovány studie, které ukazují, že transgenní rostliny obsahující overexprimovaný (nadměrně exprimovaný) gen *AtNDPK2* z *A. thaliana*, kódující nukleosiddifosfát kinázu 2 (*NDPK2*), měly nejen významně zvýšenou toleranci k rozmanitým environmentálním stresům (sucho, chlad atd.), ale také indukovaly množství genů zapojených při buněčné signální transdukcii a ochraně. Experimentálně bylo zjištěno, že *AtNDPK2* je komponentou MAPK signální dráhy aktivované peroxidem vodíku a overexprese *AtNDPK2* upravuje redox potenciál v buňkách. Kim *et al.* (2009) vložili *AtNDPK2* pod kontrolou *SWPA2* POD (oxidative stress-inducible peroxidase promoter) promotoru do rostliny *Ipomoea batatas* cv. Yulmi (povijnice batátová, batáty), která je velmi senzitivní k nízkým teplotám. Konzistentně s předešlými pracemi byla prokázána signifikantně zvýšená exprese antioxidantních enzymů, konkrétně peroxidasy (POD), askorbát peroxidasy (APX) a katalasy (CAT). POD, APX a CAT jsou hlavními enzymy detoxikujícími  $H_2O_2$ , POD se dále uplatňuje při růstu a vývoji rostlin, lignifikaci, suberinizaci a příčném propojování složek buněčných stěn. APX je také součástí glutathion askorbátového cyklu, který hraje klíčovou roli při odstraňování peroxidu vodíku. CAT eliminuje  $H_2O_2$  jeho přímým rozkladem na vodu a kyslík, a tak CAT nevyžaduje redukční sílu a má vysokou reakční rychlost, ale nízkou afinitu k  $H_2O_2$  a proto ho může odstraňovat jen v případě jeho vysokých koncentrací. Výše uvedené poznatky ukazují na zvýšenou toleranci *AtNDPK2* rostlin *I. batatas* k oxidativnímu stresu, pramenící ze zesílené exprese antioxidantních enzymů – POD, APX a CAT, jejichž regulace je pravděpodobně podřízena *NDPK2*.

Další z mnoha kauzalit zvýšené produkce volných radikálů při působení sucha a také chladu je pokles fluidity buněčných membrán a ztráta jejich funkčnosti z důvodu peroxidace

lipidů. To má za následek úbytek nenasaturovaných mastných kyselin a zvýšení rigidity membrán tvořením kovalentních vazeb mezi lipidovými radikály, vyšší teplotu fázové tranzice lipidů a degradace membrán. Důležitý enzym superoxid dismutasa (SOD) katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu a přeměňuje ho na kyslík a méně toxický peroxid vodíku ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ). McKersie *et al.* (1993) vložili Mn-SOD cDNA (SOD jsou metaloproteiny, lišící se podle kovového kofaktoru – Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) z *Nicotiana plumbaginifolia* do vojtěšky seté (*Medicago sativa*). Analýza potomstva transformantů s funkčním Mn-SOD transgenem prokázala mnohem rychlejší obnovený růst rostlin po předchozí expozici mrazovým podmínkám, v porovnání s potomstvem, které postrádalo funkční Mn-SOD transgen. Zdá se tedy, že Mn-SOD má významnou úlohu při detoxikaci volných kyslíkových radikálů produkovaných rostlinou po stresu spojeném s dehydratací. Z dalších studií ovšem vyplývá, že vybalancovaný stav mezi činnostmi SOD a enzymy, které následně katalyzují detoxikaci peroxidu vodíku (např. v glutathion askorbátovém cyklu v chloroplastech) je pravděpodobně rozhodující. Práce Tommasini *et al.* (2008) popisuje indukci genu Cu/Zn SOD u ječmene při stresu suchem a dalších enzymů zapojených v antioxidačních procesech – glutathion-disulfid reduktasa (ATGR1) a metyltransferasa, které byly exprimovány jak za sucha, tak i za stresu chladem.

### **1.11.9 Osmotické přizpůsobení**

Rostliny si k zajištění přežití a následné prosperitě potomstva v nepříznivých podmínkách prostředí vyvinuly řadu strategií, jak se s těmito okolnostmi vyrovnat. Jedním z nejčastějších obranných mechanismů rostlin je akumulace kompatibilních solutů, nízkomolekulárních vysoce rozpustných látek, např. betainu, polyalkoholů, cukrů a aminokyselin (součástí osmotického přizpůsobení je také akumulace hydrofilních proteinů, jako například některé LEA proteiny včetně dehydrinů). Osmotické přizpůsobení tkví fakticky ve snížení osmotického potenciálu ( $\psi\pi$ ), který představuje nejdůležitější složku vodního potenciálu, jenž je považován za základní pojem vodního režimu rostlin (ostatní složky vodního potenciálu nejsou akumulací kompatibilních solutů významně ovlivňovány). Procházka *et al.* (1998) uvádí, že i malé zvýšení koncentrace látky rozpuštěné ve zředěném roztoku vede k logaritmické změně aktivity vody, a tedy i vodního potenciálu. Minimální (nejbližší nule) hodnota osmotického potenciálu je dána minimem rozpuštěných iontů, proteinů a ostatních metabolitů v živé buňce.

Rostliny ječmene, které byly zatíženy suchem nebo chladem, indukovaly syntézu transkriptů genů, které kódují proteiny spojené s mechanismem ochrany membrán a

akumulací osmoprotektantů – sacharosy, rafinosy, glycin betainu, galaktinolu a prolinu. V případě sucha byly aktivovány geny sacharosa-fosfát syntasy IF, sacharosa syntasy 2, ATP-vázající galaktokinasy a betainaldehyd dehydrogenasy. Při stresu nízkou teplotou nebo při suchu byla zvýšena transkripce galaktinol syntasy,  $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylát oxygenasa (viz. níže) (Thomassini *et al.*, 2008). Jak již bylo zmíněno, molekuly osmoprotektantů se akumulují v cytoplasmě ve vysokých koncentracích za osmotického stresu a uplatňují se při udržování turgoru, stabilizaci proteinů a buněčných struktur a detoxikaci ROS (Chen *et Murata*, 2002).

Za pomoci sofistikovaných nástrojů genového inženýrství je možné z donorových organismů izolovat a následně vložit do cílových genomů rostlin geny, podmiňující biosyntézu různých kompatibilních solutů. V rostlinách je jedním z nejběžnějších kompatibilních solutů odvozených od kvartérní amonné sloučeniny betainu, glycin betain (GB), dále např. prolin betain,  $\beta$ -alanin betain, cholin-*O*-sulfát. GB působí při stabilizaci kvartérních struktur enzymů a proteinových komplexů (např. komplex uvolňující kyslík fotosystému II), podílí se také na udržování vysoce uspořádaného stavu membrán při extrémních teplotách či vysoké koncentraci solí (Chen *et Murata*, 2002). U vyšších rostlin je výchozí látkou pro biosyntézu GB, jež probíhá v chloroplastech, cholin. Cholin je konvertován na GB dvoustupňovou dehydrogenací/oxidací přes nestálý meziprodukt betain aldehyd. Reakci cholinu na intermediát betain aldehyd katalyzuje enzym cholin monooxygenasa (COM) a následnou reakci katalyzuje betain aldehyd dehydrogenasa (BADH). Sakamoto *et Murata* (1998) vytvořili transgenní rostliny rýže (*Oryza sativa*) a *Arabidopsis thaliana* (Sakamoto *et al.*, 2000), které obsahovaly gen *codA* z půdní bakterie *Arthrobacter globiformis*. Biosyntéza GB z cholinu je na rozdíl od rostlin u bakterie *A. globiformis* katalyzována jen jedním enzymem cholin oxidázou (COD). Rýže a huseniček jsou řazeni mezi tzv. neakumulátory GB, neboť nemohou produkovat GB z důvodu absence aktivity dvou výše uvedených enzymů (ve skutečnosti produkují GB ve velmi malém množství). Modifikované rostliny nesoucí gen *codA* kódující COD, kromě tolerance k mrazu (*A. thaliana*) a chladu (*O. sativa*) vykazovaly i intenzivnější toleranci k zasolení a suchu (*O. sativa*).

Dalším široce rozšířeným kompatibilním solutem v rostlinách je aminokyselina prolin (Pro). Pro se uplatňuje jako mediátor osmotického přizpůsobení, stabilizátor subcelulárních struktur, akceptor volných radikálů a jako důležitý konstituent strukturálních proteinů buněčné stěny. Vyšší rostliny syntetizují Pro přes kyselinu glutamovou (Glu) a jeho akumulace v rostlinách je zapříčiněna jednak aktivací jeho biosyntézy a naopak inaktivací degradace. Metabolizace Pro na Glu probíhá přes  $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylát (P5C) a glutamát-

$\gamma$ -semialdehyd (GSA). Tuto dráhu katalyzují dva enzymy, prolin dehydrogenasa (ProDH) v prvním kroku, P5C dehydrogenasa (P5CDH) v druhém kroku. Gen *AtProDH* (*ERD5*), který kóduje prekursor ProDH byl izolován z *A. thaliana*. Nanjo *et al.* (1999) vytvořili transgenní rostliny *A. thaliana* s *AtProDH* cDNA (komplementární DNA), která kódovala protismyslný (antisense) gen pro ProDH, který katalyzuje počáteční reakci degradace Pro. Prostřednictvím protismyslné konstrukce transgenu (tedy transgenu, jehož transkripcí vzniká RNA komplementární k mRNA určitého genu) je možné blokovat důležité enzymy biosyntetických drah (Ondřej *et Drobník*, 2002). Suprese degradace Pro u antisense rostlin *A. thaliana* vedla k vyšší akumulaci Pro, a proto byly tyto rostliny obecně tolerantnější k dehydrataci. Tento vztah ukazuje na pozitivní korelaci mezi akumulací Pro a stresovou tolerancí rostlin.

Trehalosa ( $\alpha$ -D-glukopyranosyl-[1,1]- $\alpha$ -D-glukopyranosa) je neredukující disacharid, který slouží nejen jako energetická rezerva, ale funguje také jako ochranný metabolit při působení mnoha stresů. Je dobře známo, že trehalosa má vysokou vodní retenční aktivitu, která pomáhá udržovat fluiditu buněčných membrán. Všechny dvouděložné rostliny, které měly vneseny geny z mikroorganismů, podmiňující biosyntézu tohoto disacharidu, trehalosa-6-fosfát (T-6-P) syntasa (TPS) a/nebo T-6-P fosfatasa (TPP), kromě zvýšené tolerance k abiotickým stresům vykazovaly také vývojové změny (zakrslý růst). Akumulace trehalosy působí tedy pleiotropickým způsobem. Zajímavé je, že rýže (*Oryza sativa*) se jeví jako rostlina tolerantnější k trehalose ve srovnání s dvouděložnými rostlinami, neboť růst rostlin po exogenní aplikaci trehalosy nebyl inhibován. Tohoto faktu využili Jang *et al.* (2003) a vytvořili rýži (*Ubi1::TPSP* rýže) vložением genu kódujícího bifunkční fúzi enzymů (TPSP) TPS a TPP z bakterie *Escherichia coli* pod kontrolou promotoru ubikvitinu *Ubi1* z kukuřice. Výsledkem bylo, že katalytická účinnost TPSP byla 3,5 – 4krát vyšší než směs individuálních enzymů, což demonstruje kinetické výhody fúzních enzymů. Navíc *Ubi1::TPSP* rostliny rýže nevykazovaly růstové inhibice ani jiné viditelné fenotypové modifikace navzdory vysoké produkci trehalosy a měly zvýšenou toleranci k suchu, chladu a zasolení. Výsledky této studie ukazují, že trehalosa má komplexní ochrannou aktivitu při působení abiotických stresů a že rýže je tolerantnější k syntéze a akumulaci trehalosy než dvouděložné rostliny.

## **1.12 Diferenční neboli srovnávací proteomika**

Srovnávací proteomika, která je předmětem této práce je dle definice Chmelíka (2005) založena na analýze složitých směsí bílkovin, která sleduje změny složení bílkovin při různých stavech organismu (např. sucho versus zálivka) s cílem nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující proteiny. Účelem je identifikovat proteiny, které jsou syntetizovány ve vyšší či

nižší míře, určit, zda některé proteiny chybějí, jsou modifikovány, případně zjistit výskyt proteinů nových. Srovnávací proteomika s pomocí statistických nástrojů dovoluje sestavit skupiny proteinů, které vykazují identické charakteristiky a tvoří tzv. regulony. Ty představují uskupení proteinů, jejichž geny jsou regulovány identickými nebo podobnými regulačními mechanismy (Weiser *et al.*, 2005).

Proteomika tak může sloužit k vyhledávání specifických proteinů, tzv. proteinových markerů, na základě jejich zvýšené nebo snížené exprese při nefyziologických (patologických) stavech (Collinsová *et Jiráček*, 2004). Proteinový marker lze definovat jako protein, který vykazuje reprodukovatelné rozdíly v expresi či struktuře specifické pro danou vlastnost, v případě této práce konkrétně pro suchovzdornost (toleranci k suchu).

### **1.12.1 Metoda elektroforetické separace proteinů**

Proteomika se během posledního desetiletí stala jedním z nejdynamičtějších oborů v přírodních vědách. Za to vděčí rozvoji molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky a spektroskopických a separačních metod, což přispělo k zdokonalení analýzy nukleových kyselin, separace a charakterizace bílkovin. Proteomika využívá metod s vysokou výkonností (high throughput) jako jsou dvourozměrná gelová elektroforéza (2-D), kapalinová chromatografie (LC) a hmotnostní spektrometrie (MS) s ionizací MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization, tj. laserová desorpce a ionizace s účastí matrice) nebo ESI (electrospray ionization, tj. ionizace elektrosprejem) (Štosová *et al.*, 2005). Využití výpočetní techniky pro zpracování dat získaných hmotnostní spektrometrií umožnilo rychlou identifikaci bílkovin (Chmelík, 2005).

Tradiční metodou proteomiky je dvourozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, využívaná nejen k separaci bílkovin, ale i k získávání dvourozměrných map bílkovin, které lze přímo využít k proteomické charakterizaci organismů, tkání, buněk, metabolických procesů (Chmelík, 2005). O'Farrell (1975) popsal 2-D elektroforézu jako první, a to v roce 1975, nicméně Laemmli (1970) použil elektroforetické dělení proteinů již v roce 1970. Předností 2-D metody je rozdělení jednotlivých proteinů na gelech podle dvou nezávislých biochemických charakteristik. Nejprve jsou proteiny v prvním směru rozděleny dle svých nábojů (do isoelektrických bodů, pI) a poté v kolmém směru podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je proteinová mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristickou pozici (Kovářová, 2005). S pomocí dvoudimenzionální gelové elektroforézy lze v ideálních případech rozdělit až několik tisíc proteinů. V současné době převládá používání imobilizovaných pH gradientů (rozdělení



proteinů v prvním rozměru), což do značné míry vyřešilo problém reprodukovatelnosti prvního rozměru a usnadnilo dělení bazických proteinů.

Přestože 2-DE je velmi vhodnou metodou pro separaci komplexních směsí proteinů, má tato technika i svoje nevýhody. Jednou z nich je problém širokého rozpětí koncentrací jednotlivých přítomných proteinů. V případě lidských buněk představuje toto rozpětí přibližně 7 řádů, od nejmenšího výskytu (1 kopie) po nejhojnější ( $10^6$  kopií) zastoupení proteinů přítomných v buňce ve stejném okamžiku. Používané metody barvení proteinů v gelech, včetně fluorescenčního zobrazování, však vizualizují pouze ty proteiny, které ve vzorku vykazují střední a vysokou míru výskytu. Ačkoliv technický pokrok v oblasti 2-DE a MS proteinů zvýšil citlivost, reprodukovatelnost a kapacitu proteomické analýzy, není možné analyzovat tak široké rozpětí výskytu proteinů současně. Další nevýhodou 2-DE je její časová náročnost a pracnost celého procesu, který vyžaduje specifické dovednosti a zručnost pro tvorbu kvantitativně a prostorově reprodukovatelných gelů (Collinsová *et* Jiráček, 2004).

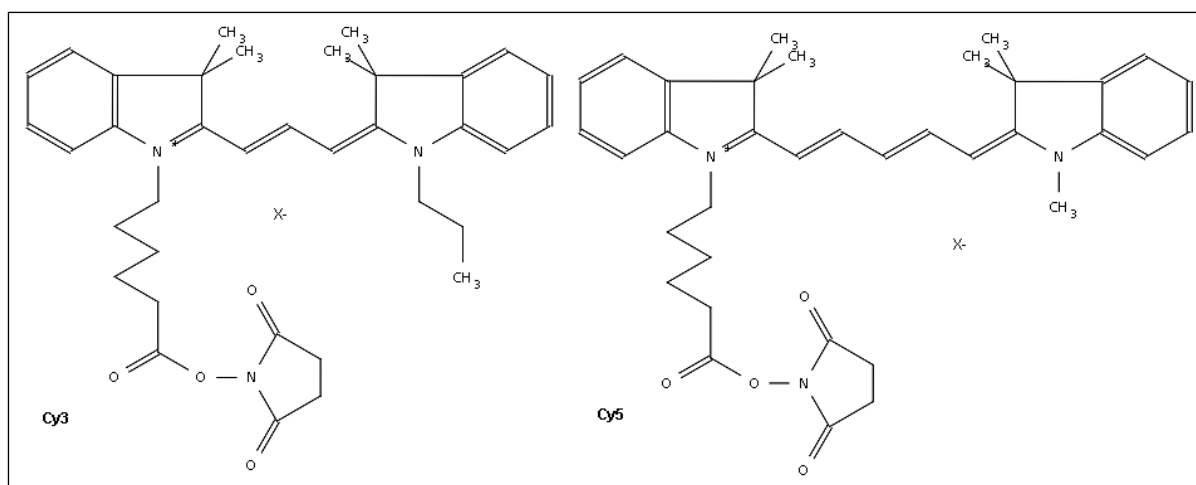
### **1.12.2 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza**

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE) je moderní modifikace dvourozměrné gelové elektroforézy (2-DE), která využívá ke značení proteinových vzorků fluorescenčních barviv CyDyes<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Little Chalfont, Velká Británie) a která byla vyvinuta v 90. letech 20. století (Ünlü *et al.*, 1997). Užití až tří barviv CyDyes ke značení proteinových vzorků před jejich dělením umožňuje nanášet na jeden gel, resp. jeden proužek s imobilizovaným pH gradientem (IPG proužek) dva různé vzorky a navíc ještě směsný vzorek. Tento vzorek vznikne smísením všech vzorků, s nimiž pracujeme v daném experimentu, a slouží jako interní standard. Tak je výrazně eliminován problém kvantifikace proteinových skvrn v jednotlivých vzorcích, resp. problém opakovatelnosti dvourozměrných gelů, který je hlavním problémem klasické dvourozměrné elektroforézy. Možnost kvantitativně porovnávat dva vzorky v jednom gelu současně spolu s přítomností interního standardu představuje hlavní výhodu 2-D DIGE oproti 2-DE, kde se na jeden IPG proužek nanáší pouze jeden vzorek. 2-D DIGE tak umožňuje rozvíjet a realizovat strategii expresní a srovnávací proteomiky tím, že daleko precizněji porovnává a kvantifikuje změny v proteinové expresi u dvou rozdílných vzorků na jednom gelu. Shodně jako u 2-DE se vybrané proteiny, separované na gelu v tzv. proteinových skvrnách, identifikují pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Na velkých gelech (24 cm velký IPG proužek) lze detegovat až několik tisíc nejčtenějších proteinových skvrn v závislosti na vzorku. To už představuje významnou část proteomu, zvláště pokud se jedná o jeho určitou frakci - subproteom (jaderný,

mitochondriální, plastidový, membránový, fosfoproteom apod.). V současnosti je 2-D DIGE jedna z vhodných a dostupných proteomických metod, která umožňuje nejen kvantifikovat a identifikovat tisíce proteinů najednou, ale také kvantifikovat různé post-translační modifikace těchto proteinů díky rozdílné pohyblivosti jejich skvrn na dvourozměrných gelech.

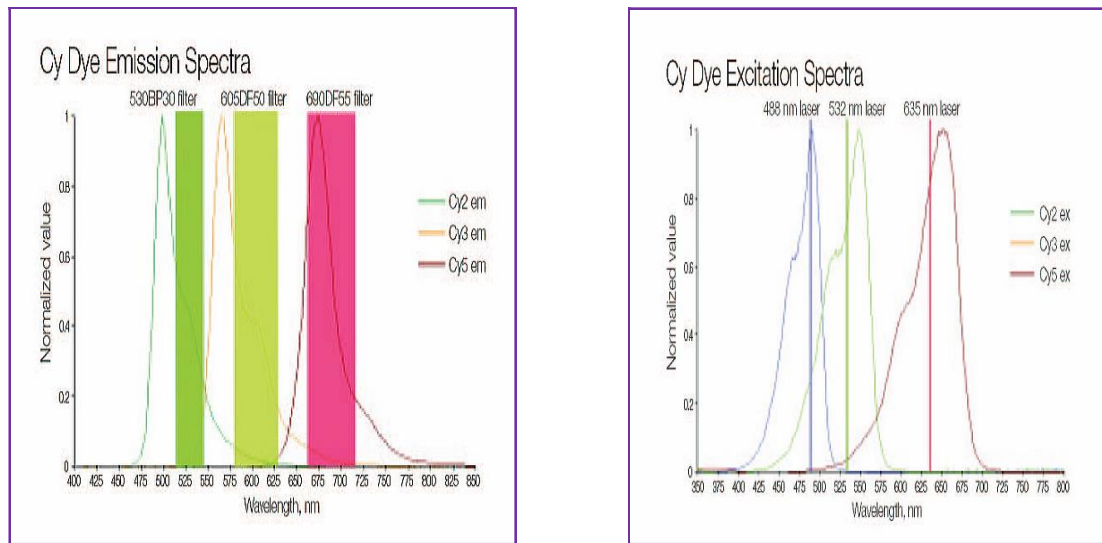
Molekula každého barviva CyDye se skládá ze tří částí – fluoroforu, spojovací části (tzv. linker) a reaktivní části, jež je nezbytná pro navázání barviva na určitý aminokyselinový zbytek v molekule proteinu vzorku.

Obrázek č. 5: Strukturální vzorce barviv Cy3 a Cy5 pro minimální barvení



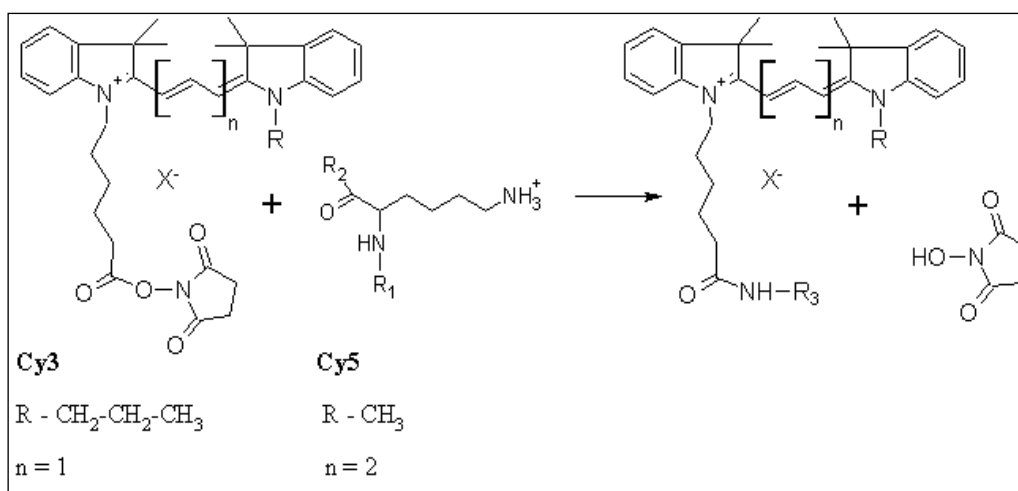
Fluorescenční barviva CyDyes mají vzájemně se nepřekrývající absorpční a emisní spektra (obrázek č. 6). Proto lze snímat samostatně jednotlivé vzorky. Barvivo Cy2, které se obvykle používá ke značení směšného vzorku používaného jako interní standard, emituje ve žluté oblasti viditelného spektra ((absorpční maximum v dimethylformamidu (DMF) 491±3 nm; emisní maximum v DMF 506±5 nm)). Barvivo Cy3 emituje v červené oblasti viditelného spektra (absorpční maximum v DMF 552±3 nm; emisní maximum v DMF 572±5 nm) a barvivo Cy5 má emisní maximum v modré oblasti viditelného spektra (absorpční maximum v DMF 648±3 nm; emisní maximum v DMF 669±5 nm).

Obrázek č. 6: Emisní a excitační spektra barviček CyDye



Další unikátní vlastností sady barviv CyDyes (Cy2, Cy3 a Cy5) je jejich téměř shodná relativní molekulová hmotnost  $M_r$  ( $M_r$  (Cy2 - kation) = 550,59;  $M_r$  (Cy3 - kation) = 582,76;  $M_r$  (Cy5 - kation) = 580,74). To znamená, že po navázání molekuly fluorescenčního barviva na molekulu proteinu se molekulová hmotnost komplexu protein-barvivo změní pro daný protein vždy o přibližně stejnou hodnotu, ať už se na daný protein naváže barvivo Cy2, Cy3 anebo Cy5. Tato vlastnost barviv CyDyes je důležitá pro následnou identifikaci separovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Obrázek č. 7: Chemický princip vazby fluorescenčních barviv na proteiny



K detekci a vyhodnocení separovaných proteinů se využívá laserový fluorescenční scanner nebo fluorescenční CCD-kamera. Pomocí speciálního softwaru (např. PDQuest od

firmy Bio-Rad, Hercules, USA) se provádí kvalitativní hodnocení na základě hodnot pI a MW a kvantitativní hodnocení proteinových skvrn.

Data získaná densitometrickou analýzou proteinových skvrn představují velice robustní vícedimenzionální soubory dat, kde hodnocená veličina - hustota proteinových skvrn, je závislou proměnnou závisící na větším počtu nezávisle proměnných, který se mění dle konkrétního uspořádání experimentu. K hodnocení tohoto typu dat se používá nejčastěji shluková (klastrová) analýza anebo analýza hlavních komponent. Proteinové skvrny vhodné pro identifikaci se většinou selektují na základě analýzy hlavních komponent nebo analýzy rozptylu, kdy se vybírají např. skvrny, které se svou hustotou liší např. minimálně 2 krát ( $\alpha = 0,05$ ) aspoň v jedné variantě experimentu. Následně se pomocí trypsinu vyřezané proteiny naštipou na peptidy, které se identifikují pomocí MS (např. MALDI-TOF/TOF, LC-MS/MS) a prohledáním proteinových a EST (Expressed Sequence Tag) databází pomocí vhodného programu (např. MASCOT, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Identifikované proteiny se následně charakterizují dle jejich molekulární a biologické funkce či výskytu pomocí vhodných internetových nástrojů (např. [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org); [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg); [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) či prohledáním vědecké literatury.

Detailní popis dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy je uveden v publikaci Vítámvás *et al.* (2010).

### **1.13 Principy hmotnostní spektrometrie v proteomice**

Hlavním úkolem hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS) je identifikace a kvantifikace proteinů, které mohou hrát významnou roli v procesech probíhajících v buňce, tj. při metabolismu, buněčném dělení nebo např. v obranných mechanismech.

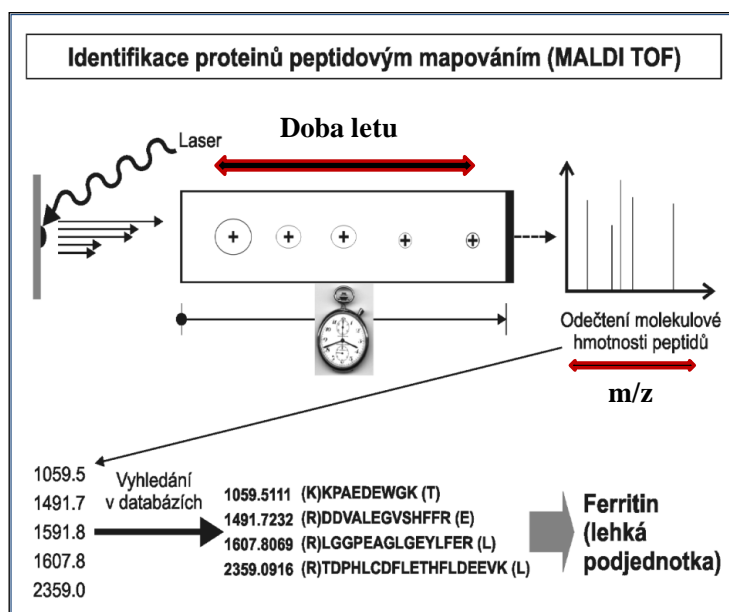
Po rozdělení směsi bílkovin vhodnou separační metodou (elektroforetickou či chromatografickou) následuje štěpení proteinů enzymatickou nebo chemickou cestou (BrCN - bromcyan) na směsi peptidů, což představuje nejběžnější strategii pro identifikaci proteinu. Cílem štěpení bílkovin je definovaně fragmentovat protein, aby jednotlivé peptidy byly dostatečně malé na optimální MS analýzu (optimum 6 – 20 AMK, cca 800 – 2 500 kDa), ale zároveň poskytly dostatečnou sekvenční informaci. Molekulová hmotnost peptidových fragmentů se pak měří na hmotnostním spektrometru s vysokou přesností. Ze všech dostupných proteolytických enzymů se v proteomice nejčastěji využívá trypsin. Jeho vlastnosti a využití popisuje Štosová *et al.* (2005) - trypsin (EC 3.4.21.4) je serinová endopeptidasa (existuje 5 charakteristických skupin peptidas: serinové, cysteinové (thiolové), aspártátové a dále peptidasy obsahující kovový iont jako kofaktor a threoninové) má

definovanou a poměrně úzkou substrátovou specifitu (štěpí za argininem a lyzinem nenásleduje-li prolin) a poskytuje peptidy o velikosti (1 – 3 tis. kDa) vhodné pro MS analýzu, které mají navíc na C-konci zbytky bazických aminokyselin argininu a lyzinu, které jsou dobře protonovány. Jeho prekurzorem je inaktivní trypsinogen. Trypsin se získává z orgánů trávicího traktu obratlovců, konkrétně pak z pankreatu. Trypsin má výsadní postavení v proteomice. A to proto, že pokud provádíme štěpení v polyakrylamidovém gelu, jedním z limitujících faktorů difuze peptidasy k substrátu je velikost její molekuly. Pro 12% polyakrylamidový gel, který je standardně používán k přípravě proteinového vzorku pro MS analýzu, byla odvozena zdánlivá velikost pórů 20 až 30 Å. Molekula  $\beta$ -trypsinu má včetně solvatačního obalu rozměry menší (17 Å). Pro větší molekuly peptidas je difuzi zabráněno se sterických důvodů.

Nejrozšířenější MS technikou v analýzy proteinů či peptidů je hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight)). Principem MALDI ionizace je nanesení malého množství vzorku společně s vhodnou matricí (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxy-skořicová a další) na terčík a následná desorpce a ionizace krátkým pulsem laseru. Výsledkem celého procesu je ionizace peptidů nebo proteinů aniž by došlo k jejich fragmentaci a jejich následná hmotnostní analýza. Ionizace MALDI je realizována ve vakuu, ale např. Godula (2005) publikoval práci, v níž popisuje pokusy realizovat MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI). Před vstupem do průletového analyzátoru hmotnostního spektrometru, jehož úkolem je rozdělit ionty podle jejich měrného náboje  $m/z$ , jsou vzniklé ionty urychleny elektrickým polem. Protože všechny ionty jsou urychleny stejným napětím, ionty s odlišným poměrem hmotnost/náboj ( $m/z$ ) budou putovat rozdílnou rychlostí a ionty s vysokou hodnotou  $m/z$  budou putovat pomaleji než menší ionty. Poměr  $m/z$  ionizovaných analytů je stanoven měřením času (TOF – Time of Flight) dopadu na detektor. Systém přepočítává dobu letu na přesnou molekulovou hmotnost, která pak dovoluje identifikaci nebo charakterizaci testovaného vzorku (Fella *et al.*, 2005).

Velmi citlivou a rychlou metodou je peptidové mapování (PMF – peptide mass fingerprinting), ve kterém jsou přesně změřené molekulové hmotnosti peptidů porovnávány s teoreticky vypočítanými hmotnostmi bílkoviny přítomné v databázi spekter peptidů, přičemž toto srovnání je provedeno pro každou bílkovinu v databázi zvlášť (obrázek č. 8). Bílkovina z databáze vykazující největší shodu při použití vhodného skórovacího algoritmu identifikuje analyzovanou bílkovinu (Řehulka *et al.*, 2007).

Obrázek č. 8: Schéma principu peptidového mapování

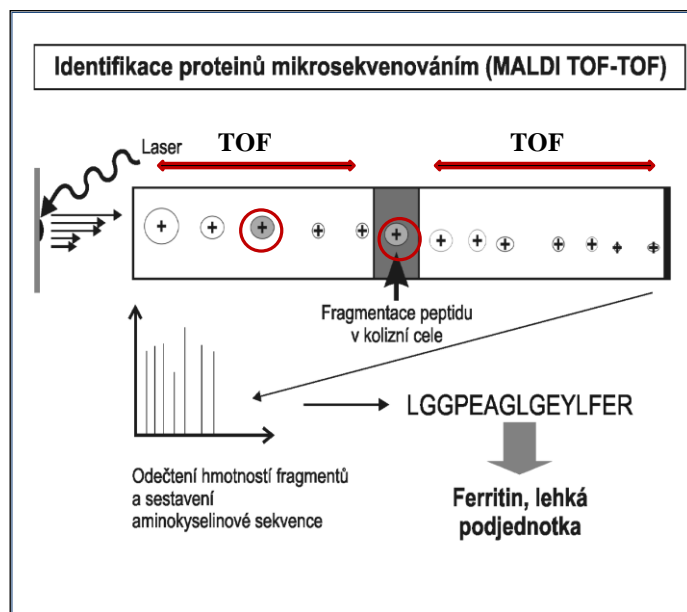


### 1.13.1 Sekvenování peptidů hmotnostní spektrometrií

Tato technika je spojena s tandemovými hmotnostními analyzátory (TOF/TOF, iontovými pastmi či konfigurace kvadrupól/průletový analyzátor TOF). V prvním hmotnostním analyzátoru je vybrán (izolován) iont dle  $m/z$ , který chceme dále fragmentovat. Následně je v kolizní cele izolovaný peptid srážkou s inertním plynem (helium nebo argon) fragmentován. Ve druhém hmotnostním analyzátoru jsou ionty rozděleny dle  $m/z$  a detekovány na detektoru (obrázek č. 9).

Zjištění sekvence peptidů může být provedeno nepřímo metodou PMF. Jak bylo popsáno výše, po úspěšné identifikaci bílkoviny jsou experimentální molekulové hmotnosti peptidů přiřazeny k sekvencím peptidů a tím je určena primární struktura analyzovaných peptidů. Principem sekvenování peptidů je, získání alespoň částečné informace o primární struktuře peptidu užitím informace získané z fragmentačního hmotnostního spektra (Řehulka *et al.*, 2007). Podrobně se hmotnostní spektrometrií proteinů zabývá např. práce Domon *et Aebersold* (2006).

Obrázek č. 9: Principiální schéma sekvenování proteinů MS/MS



### 1.14 Diskriminace izotopu $^{13}\text{C}$

Účinné využívání limitujících přírodních zdrojů rostlinami je evolučně stabilní strategií. Účinné využívání dostupné vody v širším slova smyslu (tj. účinnost její extrakce z půdy, účinnost transpirace i účinnost alokace uhlíku do rozmnožovacích orgánů) tak muselo být podmínkou evoluční zdatnosti dnes existujících hydrostabilních (homoiohydrických) druhů rostlin (Šantrůček, 2008).

Většinu vody rostliny ztrácejí průduchy. Vztah mezi fixací  $\text{CO}_2$  a ztrátou vody na úrovni listu vyplývá z existence společné dráhy vody ven z listu a  $\text{CO}_2$  do listu, tedy směny  $\text{CO}_2$  za vodu. Každé zvýšení produkce biomasy nadzemní části rostliny je zapláceno ztrátou určitého množství vody navíc. Naopak, každý i dočasný nedostatek vody se projeví menším množstvím fixovaného  $\text{CO}_2$  a akumulované sušiny (Šantrůček, 2008). Poměr fotosyntézy k transpiraci je definován jako efektivita využití vody – WUE (Water Use Efficiency). Definice WUE na úrovni listu definuje Zámečník (2008) jako integrální nahromadění sušiny ke spotřebě vody (podíl  $\text{CO}_2$  asimilace a vody, která se odpařila z listů transpirací). Hlavním fyziologickým parametrem, na kterém závisí WUE je záporná funkce poměru koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi vnitřním a vnějším prostorem listu.

WUE se obtížně a velmi pracně měří s dostatečnou přesností zvláště v polních podmínkách. Vhodný měřitelný příznak fyziologicky založené WUE, který by dobře odrážel rozdíly v účinnostech mezi druhy či odrůdami, se ukazuje být diskriminace izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  a označuje se  $\Delta^{13}\text{C}$ .

Použití stabilních izotopů ve fyziologii rostlin je možné díky tzv. izotopovému efektu, který je způsobený rozdíly ve fyzikálních a chemických vlastnostech těžkých ( $^{13}\text{C}$ ) a lehkých izotopů ( $^{12}\text{C}$ ). Zastoupení izotopů uhlíku v  $\text{CO}_2$  v atmosféře není rovnocenné (Vašková, 2009).  $^{12}\text{CO}_2$  je zastoupen v atmosféře asi z 98,9 %, zatímco těžká forma  $^{13}\text{CO}_2$  tvoří zbylých 1,1 %. Enzym Rubisco (Ribulosa-1,6-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa) katalyzující karboxylační reakci C3 rostlin, má vyšší afinitu (ochotněji váže) k  $^{12}\text{CO}_2$ , který se také rychleji pohybuje difuzí. Uhlík v suché hmotě C3 rostlin je tak ve srovnání s atmosférou ochuzen o izotop  $^{13}\text{C}$ . Tento fenomén je nazýván izotopová diskriminace uhlíku (označován  $\Delta^{13}\text{C}$ ). Tento parametr je přímo úměrný poměru  $c_i/c_a$  (intracelulární koncentrace  $\text{CO}_2$  v listu/koncentrace  $\text{CO}_2$  ve vnější atmosféře). Díky tomuto vztahu lze  $\Delta^{13}\text{C}$  využít jako náhradu za experimentálně obtížněji stanovitelný parametr WUE, který na poměru  $c_i/c_a$  závisí nepřímo úměrně. Proto je i závislost mezi  $\Delta^{13}\text{C}$  a WUE nepřímo úměrná (Farquhar *et al.* 1982). Bude-li  $c_i$  oproti  $c_a$  relativně vysoká (průduchová vodivost bude mnohem vyšší než rychlost fotosyntézy), bude  $^{13}\text{C}$  při karboxylaci silně diskriminován a hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  cukrů ( $\delta$  – izotopové složení látky) v listu bude nízká. Pokud ale situace bude opačná a průduchová vodivost bude ve srovnání s rychlostí fotosyntézy malá, potom dojde k poklesu  $c_i$ , diskriminace  $^{13}\text{C}$  se sníží a hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  cukrů se naopak zvýší (Vašková, 2009). Výhodou je, že se izotopový signál sušiny integruje po celou dobu tvorby sušiny a proto odpadá efekt okamžitého měření a variability v čase (Šantrůček, 2008).

### **1.14.1 Šlechtění rostlin na vyšší účinnost využití vody**

Zemědělská produkce suchých oblastí je většinou limitována nedostatkem srážkové vody. Periodické sucho je, zdá se, stále častějším jevem i v mírném klimatickém pásmu. Použití závlahové a obecný nedostatek užitkové vody vytvářejí tlak na pěstování odrůd plodin s vysokou účinností využití vody, tedy s vyšší produkcí biomasy nebo zrna při stejné nebo snížené spotřebě vody (Šantrůček, 2010).

Farquhar *et al.* (1982) teoreticky odvodili, že míra diskriminace těžkého uhlíku ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) by měla být nízká u rostlin, které získaly více uhlíku na jednotku spotřebované vody, tedy mají vysokou účinnost využití vody WUE. Naopak, méně účinné rostliny by měly mít relativně méně uhlíku  $^{13}\text{C}$ , protože by jej měly více diskriminovat. Tato teorie byla mnohokrát v uplynulých dvaceti pěti letech testována v laboratorních i terénních podmínkách. Potvrdila se a na jejím základě byly učiněny šlechtitelské pokusy selektovat odrůdy C3 obilnin a jiných plodin na zvýšenou účinnost využití vody žádoucí hlavně v aridních podmínkách. V sortimentu pěstovaných pšenice jsou v současné době komerčně dvě odrůdy uznané



v Austrálii „Drysdale“ a „Rees“ u jejichž zrodu stále screening na diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$ . Často se ale v pokusech ukazuje, že zvýšená WUE na úrovni listu nebo rostliny se nepromítá do vyšší produkce biomasy nebo výnosu zrna na úrovni porostu plodiny.

Většina publikovaných prací ukazuje na to, že u obilnin spíše než negativní existuje pozitivní korelace mezi výnosem (zrna nebo biomasy) a izotopovou diskriminací. Jinými slovy, vyšší výnos často poskytují genotypy s nižší listovou účinností využití vody. Příčina je pravděpodobně v tom, že se mnoho rostlin včetně pšenice a zřejmě trav obecně chová „konzervativně“, tj. při nízkém  $c_i/c_a$  a tedy vysoké WUE indikované malou hodnotou diskriminace, rostlinou rostou méně i tehdy a právě tehdy když jsou dobře zásobené vodou. Zachovávají si totiž nízkou vodivost průduchů (a tím nízké  $c_i$ ) i přes třeba výjimečný sezónní dostatek vody. Očekávaný negativní vztah mezi diskriminací a výnosem biomasy nebo zrna (a pozitivní mezi WUE a výnosem) se u nich projevuje jen při deficitu vody. Tedy jinými slovy, nízké  $c_i$  není způsobeno zvýšenou karboxylační kapacitou fotosyntetického aparátu ale přivřením průduchů. Pozitivní korelace diskriminace a růstu se dá v některých případech vysvětlit také fenologickými fázemi vývoje rostlin. Rostliny s vyšším  $\Delta^{13}\text{C}$  mají často rychlý růst v začátku vegetace, který vede k zastínění povrchu půdy listy a následnému nižšímu výparu během vegetační doby. Většina vody v půdě tak zůstává k dispozici pro transpiraci rostliny.

Pojednání o využití izotopové diskriminace při selekci na vyšší účinnost využití vody je dobré doplnit odpovědí na často diskutovaný praktický problém, a to jakým podmínkám testované rostliny vystavit a v které vývojové fázi rostlin odebírat vzorky. Šantrůček (2010) uvádí dva hlavní důvody, pro které je vhodné odebírat vzorky listů z rostlin v časně fázi vývoje a z rostlin nestresovaných suchem, dostatečně zavlažených. A to přesto, že se takový postup pro screening na účinnost využití vody může zdát paradoxní, a to z toho důvodu, proč hledat rozdíly v tom, jak se rostlina umí vypořádat se suchem, jak využije omezené množství vody, které má k dispozici, za podmínek, kdy žádné sucho nenastalo? Ukazuje se, že:

1. opakovatelnost výsledků  $\Delta^{13}\text{C}$  analýz a dědivosti WUE je nejvyšší pokud ještě nebyla změněna prostředím, nepřibyla k nim environmentální složka, třeba sucho před metáním, které mění vodivost průduchů odlišně u různých genotypů a tím ovlivní podstatně  $\Delta^{13}\text{C}$  a rozdíly v diskriminaci mezi liniemi,
2. Odběr v rané fázi ontogeneze umožní použití těch rostlin pro zpětné křížení, které byly (několik týdnů před kvetením) testovány. Tím se urychlí proces křížení a následného výběru. Obě zmíněné zásady předpokládají, že WUE je vlastnost, která se dědičně

předává potomstvu. To může mnohým připadat jako mylný předpoklad protože rychlost fotosyntézy i otevření průduchů je jistě řízeno mnoha geny kvantitativně

Je ovšem nutno si uvědomit, že vysoká hodnota WUE na úrovni listu a rostliny není zárukou vysoké WUE v agronomickém smyslu (poměr výnosu zrna a spotřebované vody za život rostliny). Interferující vlivy sklizňového indexu, frakce vody vypařené z povrchu půdy a rychlosti zapojení porostu vedou k tomu, že se výnosné odrůdy nemusí nutně vyznačovat nízkou hodnotou  $\Delta^{13}\text{C}$  v jejich sušině. Řešení problémů může přinést spojené úsilí fyziologů, šlechtitelů a molekulárních biologů (např. nalezení QTL pro znak účinnosti využití vody (Šantrůček, 2010).

Zajímavou proteomickou studii spojenou s fenoménem diskriminace  $^{13}\text{C}$  publikovali Bonhomme *et al.* (2009) na osmi genotypech topolu (*Populus × euamericana*). Kosová *et al.* (2011a) shrnuje ve své publikaci výsledky této práce, ve které byly analyzovány změny v abundanci proteinů způsobené vlivem sucha u osmi různých genotypů topolů lišících se odolností k suchu (vyjádřenou parametrem  $\Delta^{13}\text{C}$ ) a našli korelaci mezi změnami v parametru  $\Delta^{13}\text{C}$  a změnami v abundanci proteinových spotů pro 45 různých proteinů. Největší část těchto proteinů představovaly (vcelku logicky) enzymy související s fixací uhlíku (Rubisco aktivasa,  $\alpha$ -podjednotka ATP synthasy, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, triosofosfátisomerasa), avšak kromě těchto proteinů byla statisticky významná korelace mezi  $\Delta$  a abundancí zjištěna i pro spermidinsynthasu, monodehydroaskorbátreduktasu (MDAR), chloroplastový elongační faktor G, glycindehydrogenasu, feredoxin-dependentní glutamátsynthasu (enzym účastnící se fotorespirace), 2,3-bisfosfoglycerát-independentní fosfoglycerátmutasu (enzym účastnící se glykolózy), sukcinyl-CoA ligasu, akonitáthydratasu (enzym Krebsova cyklu), S-formylglutathionhydrolasu a dvě isoformy HSP70 proteinu. Tyto identifikované proteiny tak vlastně představují možné proteinové markery pro parametr  $\Delta^{13}\text{C}$ . Porovnání proteinové odezvy na stres u různých genotypů navíc umožňuje detekovat pro dané proteiny alely, které podmiňují jejich vyšší (či nižší) míru exprese, a tak kvantitativně ovlivňují určitý fenotypový znak podmiňující vyšší odolnost. Výsledkem proteomické analýzy tak může být vytipování vhodných alel, resp. jejich donorů (genotypů) podmiňujících míru exprese určitých proteinů, a tím nepřímo i míru dosahované odolnosti daných genotypů. Studie Bonhomme *et al.* (2009) tak vlastně ukazuje možnosti aplikace proteomické analýzy při hledání vhodných proteinových markerů pro kvantitativní fenotypové znaky související s odolností rostlin vůči působení různých stresových faktorů. Autorům se podařilo najít proteiny, jejichž akumulace vykazovala statisticky významnou souvislost s parametrem  $\Delta^{13}\text{C}$ .

## **Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky**

Studie tak naznačuje možnosti, jak by analýza změn rostlinného proteomu mohla přispět k vyhledání vhodných genetických zdrojů nesoucích vhodné alely určitého genu (proteinu) podmiňujícího vyšší či nižší hodnotu určitého kvantitativního fenotypového znaku podmiňujícího odolnost a tím i ke zlepšení odolnosti rostlin vůči určitému stresovému faktoru, ať už s využitím metod klasického šlechtění, anebo s využitím transgenose.

## **2 HYPOTÉZY DISERTAČNÍ PRÁCE**

Různé odrůdy ječmene vykazují rozdílnou odolnost vůči suchu a je možné je od sebe odlišit pomocí akumulace vybraných proteinových biomarkerů (dehydrinů), které lze potenciálně aplikovat ve šlechtitelských programech.

Určité charakteristiky aktuálního (vodní sytostní deficit, osmotický potenciál) a dlouhodobějšího (izotopová diskriminace uhlíku izotopu  $^{13}\text{C}$ ) fyziologického stavu rostlin korelují s mírou exprese těchto proteinových biomarkerů a je tedy potenciálně možné využít je jako indikátory, které mohou pomoci dokreslit složité vztahy mezi mírou suchovzdornosti daného genotypu, jeho proteinovým spektrem a akumulací dehydrinů.

Existují další proteiny vyjma dehydrinů, které mohou být potenciálně využity k markerovacím analýzám ve šlechtění suchovzdornosti ječmene.

### **3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE**

Cílem disertační práce je popsat akumulaci, případně dynamiku stresových proteinů dehydrinů u vybraných odrůd ječmene při stresu suchem, a to v závislosti na fenologické fázi rostlin, míře a délce trvání stresových podmínek a rozlišit tyto odrůdy dle akumulace dehydrinu/ů, případně podle jejich expresního profilu

Charakteristika akumulace dehydrinových proteinů bude doplněna o další ukazatele fyziologického stavu rostliny (vodní sytostní deficit, osmotický potenciál, diskriminace izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$ ), je-li exponována v podmínkách, které nejsou pro její růst, vývoj a reprodukci optimální (sucho).

Jedním z výstupů disertační práce bude popis exprese proteinů, které jsou statisticky signifikantně diferenciatně akumulovány po vystavení vybrané odrůdy ječmene stresu suchem a vytipování klíčových proteinů, které se zjevně účastní biochemicko-fyziologicko-fenotypové reakce na tento stresor. Mezi těmito proteiny mohou být identifikovány potenciální proteomické biomarkery, které by mohly být aplikovatelné v běžné šlechtitelské praxi. V souladu s celosvětovým trendem aplikace molekulárně-genetických metod ve šlechtění, tzv. markery asistovaná selekce (MAS), bude možné pomocí těchto markerů sofistikovat zdlouhavý a náročný šlechtitelský proces, usnadnit a zejména urychlit tvorbu nových, tolerantnějších a výkonějších odrůd ječmene.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Organizace pokusů

Pěstování rostlin bylo realizováno v podobě nádobových pokusů v regulovaných podmínkách skleníků Oddělení genetiky a šlechtitelských metod Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i (VÚRV). Pro všechny typy pokusů byla společná metodika klíčení a následného vysazování klíčenců. Obilky ječmene byly umístěny na polystyrenovou destičku ovinutou navlhčeným filtračním papírem. Tato destička s obilkami byla poté uzavřena do plastové nádoby s cca 2 mm vodní vrstvičky s průhledným víkem a umístěna do termostatického boxu při 21-24 °C po dobu 48 hodin. Naklíčené obilky byly vysety do květináčů (10 rostlin/květináč), které obsahovaly 3 400 g půdní směsi tvořené šesti díly zeminy, dvěma díly prosátého půdního substrátu a jedním dílem písku. Vlhkost půdy, do které byli klíčenci vysázeni byla 50-55 % půdní vodní kapacity (PVK). Rozměry květináčů byly 24,5 cm horní průměr, 13,5 cm průměr podstavy, výška květináče 20 cm. Vlhkost půdy byla monitorována gravimetrickou metodou. Teplotní a světelné parametry ve skleníku byly nastaveny takto: 20 °C, 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

Vždy bezprostředně po odběru vzorků byl stanoven vodní sytostní deficit (VSD) podle Čatského *et al.* (1965). Pletivo pro následné dehydrinové a osmotické analýzy bylo zváženo a zmrazeno v tekutém dusíku a vzorky byly uchovávány při -80 °C. Pletivo pro izotopové analýzy bylo po odebrání vysušeno při 80 °C do konstantní hmotnosti a uchováváno v plastových zkumavkách.

Analyzovány byly také vzorky ze společného nádobového experimentu s Mendelovou univerzitou v Brně. Tento pokus byl koncipován jako venkovní. Obilky testovaných odrůd byly vysety do 6. nádob o objemu 8 l (9 rostlin/květináč). Po výsevu byla v celém experimentu udržována vlhkost na 75 % PVK. Po čtyřech týdnech byla aplikována diferencovaná záливka, čímž od sebe byly odlišeny pokusné varianty.

## 4.2 Biologický materiál

Tabulka č. 2: Použitý biologický materiál

Rostlinný druh/forma	Název odrůdy	Charakteristika odrůdy	Původ odrůdy	Zdroj
ječmen/jarní	Akcent	Sladovnický ječmen, polopozdní, nízkého typu s dobrou odolností proti poléhání a lámání stébel. Velmi dobrý zdravotní stav a vysoká sladovnická kvalita.	Česká republika	LPO 1992
ječmen/jarní	Amulet	Poloraná odrůda nízkého typu, zrno velké, výtěžnost předního zrna vysoká, odolnost proti poléhání, vysoký výnos a podíl předního zrna v podmínkách trvalých přísušků.	Česká republika	SDO 1998
ječmen/jarní	Bojos	Sladovnická odrůda. Je doporučena pro výrobu českého piva. Výnos předního zrna ve všech oblastech a variantách středně vysoký až vysoký. Rostliny středně vysoké až vysoké, méně odolné proti poléhání. Zrno středně velké, podíl předního zrna středně vysoký.	Česká republika	SDO 2011
ječmen/jarní	Er	Linie ze selekce z původních syrských krajových odrůd poddruhu <i>H. vulgare</i> L., spp. <i>spontaneum</i> (citlivá vůči suchu).	Sýrie	
ječmen/jarní	Jersey	Polopozdní sladovnická odrůda. Výnos předního zrna je v řepařské a obilnářské oblasti a v neošetřené variantě v bramborářské oblasti nízký, v kukuřičné oblasti a v ošetřené variantě středně vysoký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, náchylné na poléhání. Zrno je středně velké až malé, podíl předního zrna je středně vysoký až nízký.	Nizozemí	SDO 2010
ječmen/jarní	Malz	Polopozdní, plastická, sladovnická, středního vzrůstu, vhodná do všech oblastí pěstování, zdravotní stav dobrý, vykazuje střední odolnost vůči chorobám, dobrou odolnost proti poléhání, velmi dobrá odolnost proti lámání stébla.	Česká republika	SDO 2006
ječmen/jarní	Tadmor	Linie vyselektovaná z původních syrských krajových odrůd, náleží do druhu <i>Hordeum vulgare</i> L. Je dobře adaptována na terminální suchu.		
ječmen/jarní	Tolar	Pozdní sladovnická odrůda. Výnos předního zrna je ve všech oblastech nízký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, středně až méně odolné proti poléhání. Zrno je středně velké, podíl předního zrna je nízký.		SDO 2010

SDO – Seznam doporučených odrůd

LPO – Listina doporučených odrůd

## 4.3 Stanovované charakteristiky

### 4.3.1 Definice charakteristik

#### 4.3.1.1 Obsah dehydrinů

Největší skupinou ochranných proteinů indukovaných stresem spojeným s dehydratací pletiv jsou proteiny skupiny LEA (Late Embryogenesis Abundant). Mezi tyto proteiny patří i dehydriny (DHNs). Do dnešní doby bylo v genomu ječmene (*Hordeum vulgare* L.) identifikováno 13 dehydrinových genů. Protože působení abiotického stresu je velmi často spojeno s dehydratací buněk a akumulace dehydrinových proteinů velmi často koreluje s odolností rostliny k stresovým podmínkám, resp. suchu, dehydriny by mohly být významnými aplikovatelnými markery suchovzdornosti rostlin.

#### 4.3.1.2 Diferenciálně se akumulující proteiny

Srovnávací proteomika je založena na analýze složitých směsí bílkovin a sleduje změny složení bílkovin při různých stavech organismu (např. sucho versus závlivka), s cílem nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující (akumulující) proteiny. Účelem je identifikovat proteiny, které jsou syntetizovány ve vyšší či nižší míře, určit, zda některé proteiny chybějí, jsou modifikovány, případně zjistit výskyt proteinů nových. Srovnávací proteomika s pomocí statistických nástrojů dovoluje sestavit skupiny proteinů, které vykazují identické charakteristiky a tvoří tzv. regulony. Ty představují uskupení proteinů, jejichž geny jsou regulovány identickými nebo podobnými regulačními mechanismy.

#### 4.3.1.3 Vodní sytostní deficit

Vodní sytostní deficit (VSD) je jedním z nejvhodnějších indikátorů vodní bilance rostliny především proto, že je hodnotou kvantitativní, vyjádřitelnou i absolutním množstvím vody, které rostlině chybí do plného nasycení. VSD je definovaný jako rozdíl mezi obsahem vody v rostlině v daném okamžiku a obsahem vody při maximálním nasycení (maximální turgescenci) vyjádřený v procentech maximálního obsahu vody.

#### 4.3.1.4 Osmotický potenciál

Jedním z nejčastějších obranných mechanismů rostlin v nepříznivých podmínkách je akumulace kompatibilních solutů, nízkomolekulárních vysoce rozpustných látek, např. betainu, polyalkoholů, cukrů a aminokyselin (součástí osmotického přizpůsobení je také akumulace hydrofilních proteinů, jako například některých LEA proteinů včetně dehydrinů). Osmotické přizpůsobení tkví fakticky ve snížení osmotického potenciálu ( $\psi\pi$ ), který



představuje nejdůležitější složku vodního potenciálu, jenž je považován za základní pojem vodního režimu rostlin.

Osmotický potenciál (OP) buňky je tlak, pod nímž do cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu vniká čistá voda. Je tím vyšší, čím je vyšší koncentrace osmoticky aktivních látek v buňce.

### **4.3.1.5 Diskriminace uhlíku $^{13}\text{C}$**

Poměr fotosyntézy k transpiraci je definován jako efektivita využití vody – WUE (Water Use Efficiency). Definice WUE na úrovni listu je vymezena jako celkové množství asimilovaného uhlíku ke spotřebě vody (podíl  $\text{CO}_2$  asimilace a vody, která se odpařila z listů transpirací). WUE se obtížně a velmi pracně měří s dostatečnou přesností. Vhodný měřitelný příznak fyziologicky založené WUE, který by dobře odrážel rozdíly v účinnostech mezi druhy či odrůdami, se ukazuje být diskriminace izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  a označuje se  $\Delta^{13}\text{C}$ . Mezi  $\Delta^{13}\text{C}$  a WUE je negativní korelace (Chen *et al.*, 2011).

## **4.3.2 Stanovení charakteristik**

### **4.3.2.1 Odběr vzorků k dehydrinovým a proteomickým analýzám**

Odběr vzorků pro proteinové analýzy byl prováděn výhradně v rukavicích. List byl odstřižen zhruba 1,5-2 cm od pochvy, špička byla rovněž odstřižena v délce 1,5-2 cm. Poté byly listy rozstříhány na stejně dlouhé segmenty, které byly promíchány, náhodně vybrány, zváženy (optimum cca 500 mg) a zabaleny do alobalu, který byl opatřen popisem (označení vzorku, váha, datum) a vzorek byl vhozen do tekutého dusíku. Poté byly vzorky přeneseny do hlubokomrazicího boxu ( $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Pro proteomické analýzy bylo využito pletivo dokonale omytých odnožovacích uzlů. Postup vzorkování byl shodný s výše uvedeným.

### **4.3.2.2 Vodní sytostní deficit**

Pro měření vodního sytostního deficitu byly odebrány tři krát dva plně vyvinuté listy z každé varianty pokusu. Z listových čepelí byly ostrým skalpelem vytvořeny segmenty o délce 1 cm, které byly bezprostředně zváženy na torzních vahách a umístěny do sytících komůrek z polyuretanových destiček, které byly plně nasyceny vodou. Celá destička se segmenty listů byla překryta navlhčeným filtračním papírem. Syčení probíhalo přesně 3 hodiny, neboť za tuto dobu by mělo dojít k plnému nasycení pletiv. Následně byly segmenty zváženy a ve skleněných váženkách vysušeny do konstantní vlhkosti při 95

°C. Následovalo zvážení sušiny a ze zjištěných hmotností byla vypočtena průměrná hodnota VSD.

$$VSD[\%] = \frac{M_n - M_p}{M_n - M_s} \times 100$$

$M_n$  – hmotnost pletiva po nasycení

$M_p$  – hmotnost pletiva počáteční

$M_s$  – hmotnost sušiny

#### **4.3.2.3 Osmotický potenciál**

Pro měření osmotického potenciálu byly odebrány tři krát dva plně vyvinuté listy z každé varianty pokusu. Listové pletivo bylo stlačeno do sterilní injekční stříkačky utěsněné parafilmem a okamžitě zmrazeno v tekutém dusíku. Další skladování probíhalo při -80 °C v mrazicím boxu.

Před vlastním měřením byly injekční stříkačky se vzorky ponechány při pokojové teplotě, a to až do naprostého rozmrazení. Z rostlinného materiálu v každé ze stříkaček, bylo tlakem vymáčknuto několik kapek buněčné šťávy. Z té bylo poté prováděno vlastní psychrometrické měření na přístroji Wescor Hr-33 micrometer (Prášil *et al.*, 2007).

#### **4.3.2.4 Izotopová diskriminace $^{13}C$**

Izotopové složení látky se vyjadřuje jako rozdíl izotopového poměru vzorku a standardu vztažený na izotopový poměr standardu. Za standard je považován třetihorní vápenec belemnitého původu formace PD. Standard zajišťuje mezilaboratorní srovnatelnost.

$$\delta^{13}C[\text{‰}] = \left( \frac{R \text{ vzorek}}{R \text{ standard} - 1} \right) \times 1000$$

$$R = \frac{^{13}C}{^{12}C}$$

V této práci je diskriminace izotopu  $^{13}C$  vyjadřována jako tzv. „velká“ delta –  $\Delta^{13}C$ , jejíž vztah k „malé“ deltě  $\delta^{13}C$  lze vyjádřit následovně, přičemž současné složení atmosféry ( $\delta^{13}C$  vzduch) je -8 ‰.

$$\Delta^{13}C[\text{‰}] = \frac{\delta^{13}C \text{ vzduch} - \delta^{13}C \text{ vzorek}}{1 + (\delta^{13}C \text{ vzorek}/1000)}$$

Pletivo pro izotopové analýzy bylo po odebrání vysušeno při 80 °C do konstantní hmotnosti a uchovávalo v plastových zkumavkách. Měření bylo prováděno izotopovým poměrovým hmotnostním spektrometrem (Isotope ratio mass spectrometer – IRMS) po převedení na plynný CO<sub>2</sub> spálením. Izotopová diskriminace <sup>13</sup>C byla stanovena na MS (IRMS) ve VÚRV, v.v.i.

### **4.3.2.5 Statistické hodnocení**

Statistické hodnocení bylo prováděno analýzou rozptylu (ANOVA) a faktorovou analýzou pomocí programu Statistika CZ verze 9.0. Hodnoty z analýzy rozptylu byly dále podrobněji vyhodnoceny Tukeyho testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Výsledky 2-D DIGE byly vyhodnoceny za pomoci shlukové analýzy (metoda hierarchického shlukování), která byla rovněž uskutečněna za pomoci programu Statistika CZ verze 9.0.

## **4.4 Optimalizace extrakce frakce bohaté na dehydriny**

Primárním předpokladem pro následné dehydrinové analýzy byla optimalizace a verifikace metody izolace proteinové frakce, která je bohatá na dehydrinové bílkoviny. Byly zvoleny dva metodické postupy extrakce dehydrinových proteinů podle dvou autorů a jedna modifikace.

Použitá technická zařízení, chemikálie a roztoky jsou uvedeny v Příloze č. 1.

### **4.4.1 Metoda extrakce frakce bohaté na dehydriny podle Vítámvás *et al.* (2007)**

Proteiny se extrahují z rozdrčených listů (v třecích miskách pod tekutým dusíkem) extrakčním pufrem s obsahem inhibitorů proteáz, které brání proteolýze proteinů ve vzorku (100 mM TRIS, pH 9 a inhibitor proteáz Complete, EDTA-free – Roche). Během extrakce proteinů se s výhodou využívá rozpustnosti dehydrinů po varu k obohacení proteinové frakce o tuto skupinu proteinů.

Při extrakci proteinů je nezbytné pracovat v rukavicích. Vzorek by měl být stále vychlazený, pokud není uvedeno jinak.

### **Metodický postup extrakce frakce bohaté na dehydriny podle Vítámvás *et al.* (2007)**

1. Vysterilizované a předchlazené třecí misky s tloučky důkladně vychladit tekutým dusíkem.

2. Vhodit vzorek pletiva do tekutého dusíku v třecích miskách a důkladně rozetřít na naprosto homogenní jemný prášek.
3. Dolít tekutý dusík do misky a přidat adekvátní množství extrakčního pufru (na 1 g vzorku 5 ml extrakčního pufru).
4. Opět rozetřít vzorek i s extrakčním pufrem na jemný prášek a pozvolna nechat rozmrazat.
5. Po rozmrznutí přenést pipetou suspenzi do centrifugačních kyvet (15 ml) a zvortexovat.
6. Centrifugace suspenze 20 minut při 3 000 g v předem vychlazené centrifuze (4 °C).
7. Supernatant rovnoměrně rozpipetovat do předem vychlazených 2 ml plastových zkumavek.
8. Centrifugace vzorků 30 minut ve vychlazené centrifuze (4 °C) při 20 000 g.
9. Přepipetovat supernatant do 2 ml zkumavek a povařit je 15 minut ve vodní lázni.
10. Po varu vzorky 10 minut chladit na ledu a občas překloupit.
11. Povařený extrakt centrifugovat 20 minut při 20 000 g.
12. Pokud není supernatant čirý, je přenesen do nových 2 ml zkumavek a opakuje se předešlý bod.
13. Napipetovat 250 µl supernatantu do 1,5 ml zkumavek a zvortexovat.
14. Ke každému vzorku napipetovat 1,25 ml ledové směsi acetonu+merkaptetoetanolu (1díl vzorku/5 dílů aceton+merkaptetoetanol) – (práce v digestoři).
15. Srážení vzorků přes noc při -20 °C.
16. Po vysrážení proteinů centrifugovat 15 minut při 20 000 g a supernatant vylít – (práce v digestoři).
17. K sedimentované peletě je napipetováno 500 µl 83% ledového acetonu a každý vzorek je zvortexován a 10 minut centrifugován při 20 000 g – (práce v digestoři).
18. Vylít aceton a vzorky se nechají přes noc vyschnout v digestoři. Poté jsou uchovávány při -20 °C.

#### **4.4.2 Metoda extrakce frakce bohaté na dehydriny podle Sun *et al.* (2009)**

Alternativně k výše uvedenému postupu byla testována rychlejší izolace dehydrinové frakce podle Sun *et al.* (2008), který popisuje homogenizaci pletiva v extrakčním pufru jiného složení (50 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 20 mM NaCl a inhibitor proteáz Complete, EDTA-free – Roche) a modifikace této metody s použitím acetonu.

### **Metodický postup extrakce frakce bohaté na dehydriny dle Sun *et al.* (2009)**

1. Vysterilizované a předchlazené třecí misky s tloučky důkladně vychladit tekutým dusíkem.
2. Vhodit vzorek pletiva do tekutého dusíku v třecích miskách a důkladně rozetřít na naprosto homogenní jemný prášek.
3. Dolít tekutý dusík do misky a přidat adekvátní množství extrakčního pufru (na 1 g vzorku 5 ml extrakčního pufru).
4. Opět rozetřít vzorek i s extrakčním pufrem na jemný prášek a pozvolna nechat rozmrazat.
5. Po rozmrznutí přenést pipetou suspenzi do centrifugačních kyvet (15 ml) a centrifugovat 10 minut při 10 000 g v předem vychlazené centrifuze (4 °C).
6. Supernatant přepipetovat do nových 2 ml zkumavek a uchovávat při -80 °C.

#### **4.4.3 Modifikace metody izolace frakce bohaté na dehydriny podle Sun *et al.* (2009)**

K supernatantu získanému v kroku č. 6 (uvedeno výše) přidat (ledový) aceton a vzorky umístit 12 hodin v mrazicím boxu (-20 °C), čímž jsou obsažené proteiny vysráženy. Vzorky centrifugovat 15 minut při 20 000 g (4 °C) a supernatant slít. Proteinové pelety vysušit v digestoři a uskladnit při -20 °C.

## **4.5 Elektroforetické dělení proteinů**

### **4.5.1 Příprava gelů**

Skla a těsnící gumičky musí být důkladně opláchnuty destilovanou vodou a etanolem. V dalším kroku se poskládá set na gel (dle návodu pro dané elektroforetické zařízení) a připraví se 10% SDS-PAGE gel (tabulka č. 3; uvedené množství je pro Multigel-Long elektroforézu od firmy Bio-Rad). Pro zjednodušení textu jsou použité roztoky označeny písmeny. Složení roztoků je uvedeno v Příloze č. 1.

Namíchaný gel se napipetuje (pipetou o objemu 5 a více ml) mezi elektroforetická skla asi 2,5 cm pod vrchní okraj skla (důležité je vyvarovat se vzduchovým bublinám). Dále se na gel opatrně napipetuje destilovaná voda (tím je zamezeno přístupu vzduchu, který inhibuje polymeraci) a 45 minut gel polymeruje. Poté se voda slije, povrch gelu a prostor mezi skly se opatrně vysuší filtračním papírem.

*Tabulka č. 3: Dělicí gel na 2 skla*

chemikálie	objem
H <sub>2</sub> O	10,1 ml
Acrylamide/Bis Solution	8,31 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8 (D)	6,25 ml
10% SDS (G)	250 µl
TEMED	19,5 µl
10% APS (F)	66,24 µl

Po namíchání zaostřovacího gelu (tabulka č. 4) se gel rychle napipetuje mezi elektroforetická skla až po okraj a vloží se hřeben na tvorbu jamek (v našem případě je to hřeben na 24 jamek, do 1 jamky se vejde cca 10 µl vzorku). Gel polymeruje cca. 25 min. Poté se odstraní gumové těsnění a skla s gelem se připevní k elektroforetickému přístroji. Komory se zaplní roztokem **H**, opatrně se odstraní hřebeny, pokud je to nutné, tak se vyženou vzduchové bubliny na spodním okraji gelu injekční stříkačkou. Elektroforetická cela se napojí na chlazení. Následuje nanášení vzorků.

*Tabulka č. 4. Zaostřovací gel na 2 skla*

chemikálie	objem
H <sub>2</sub> O	6,5 ml
Acrylamide/Bis Solution	1 ml
0,5M Tris – HCl, pH 6,8 (E)	2,5 ml
10% SDS (G)	100 µl
TEMED	16 µl
10% APS (F)	64 µl

### **4.5.2 Příprava a nanášení vzorků**

K vysráženým proteinům rozpustným po varu se přidá vhodné množství vzorkového pufru **J**. Sraženina se rozpustí mícháním na vortexu (cca 10 min). Rozpuštěné proteiny se na 5 min vystaví teplotě 95 °C v termobloku a pak se přenesou na led (5 min). Po centrifugaci (5 min, 20 000 g) se vzorek vhodně naředí vzorkovým pufrům **J**. Koncentrace proteinů je stanovena spektrofotometricky pomocí DC Protein Assay (Bio-Rad) na NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen). Na 1-D SDS-elektroforézu (Biometra) se do každé jamky v SDS-PAGE gelu nanese vždy příslušné množství proteinů od každého vzorku (15 µg) a kaleidoskopický standard „Kaleidoscope Prestained Standards“ (Bio-Rad) pro srovnání elektroforetické pohyblivosti bendů (kDa) a ověření úspěšného přenosu proteinů z gelu na membránu.

### **4.5.3 Elektroforetická separace vzorků**

Po nanesení vzorků do jamek se propojí elektrody se zdrojem stejnosměrného proudu. Během elektroforézy je nezbytné sledovat čelo markerovací barvy (bromfenolová modř). Pro elektroforézu v zaostřovacím gelu se nastaví 10 mA/gel, 280 V a 150 W. Když čelo markerovací barvičky dosáhne až do dělicího gelu, proud se zvýší na 25 mA/gel. Elektroforéza se ukončí, jakmile se markerovací barva dostane na konec gelu (neměla by vyputovat z gelu). Po ukončení elektroforézy se oddělí skla od sebe a gel je přenesen do velikostně odpovídající Petriho misky a přeje se roztokem **I** (15 min).

### **4.5.4 Přenos proteinů z gelu na membránu**

Blotovací filtrační papíry (6 ks/gel) a nitrocelulosové membrány (s membránou manipulovat jen pomocí pinzet) se nastříhají přesně podle velikosti gelů. Před sestavením blotu (Fast-blot od Biometry) se papíry i membrány inkubují 15 min v roztoku **I**. Na anodu (+) jsou na sebe nastohovány tři blotovací papíry, membrána, gel a opět tři blotovací papíry. Mírným tlakem (např. pomocí skleněné tyčinky) se odstraní vzduchové bubliny mezi jednotlivými vrstvami a nasadí se víko s katodou (-). Na zdroji je nastaven proud 1 mA na 1 cm<sup>2</sup> gelu (tj. cca 100 mA), 5 W, 150 V. Po 1 h se ukončí přenos a membrána se přenesse do Petriho misky (navrch stranou, kde byl gel) a promyje krátce vodou. Membrána se poté může vysušit na filtračním papíru a skladovat na suchém místě, nebo rovnou použít pro další kroky hybridizace.

### **4.5.5 Hybridizace membrány s protilátkami a vizualizace dehydrinů**

Nádoba na hybridizaci membrán musí být přiměřeně velká Petriho miska nebo plastová čtverhranná miska (měla by mít hladké dno bez výstupků). Misky s membránou a roztoky se pomalu promíchávají na třepačce při pokojové teplotě. Postupuje se dle manuálu kitu „Blot Assay Kit, GAR-AP conjugate, with BCIP/NBT (Bio-Rad)“:

#### **Metodický postup hybridizace membrány s protilátkami a následná vizualizace**

1. Membrána se inkubuje 3 min v roztoku **K** (TBS).
2. Roztok **K** se slije a membrána se blokuje 1 h v roztoku **M**.
3. Blokační roztok **M** se slije a přidá se roztok **L** (TTBS). Třepe se 10 min.
4. Roztok **L** se slije a přidá se roztok **O** (primární protilátka). Membrána s primární protilátkou se inkubuje 2 h, nebo přes noc ve 4 °C.

5. Roztok **O** se slije a uschová pro další použití (-20 °C). Membrána se dvakrát promyje roztokem **L** (TTBS) po dobu 5 min.
6. Roztok **L** se slije a přidá se roztok **P** (sekundární protilátka). Membrána se s roztokem **P** inkubuje 90 min.
7. Slít roztok **P** a promýt dvakrát membránu v roztoku **L** (5 min). Poté se membrána promyje v roztoku **K** (5 min).
8. Membrána se inkubuje v roztoku **Q** (barvu vyvíjející roztok). Je důležité vyvíjení membrány sledovat a až se objeví proužky (cca 30 - 45 min), tak reakci zastavit promýváním ve vodě (2x 10 min).
9. Membrána se oskenuje a proužky se kvantifikují vhodným softwarem (QuantityOne od Bio-Radu). Membrána se vysuší při pokojové teplotě na filtračním papíře a může se skladovat např. v poštovních obálkách.

#### **4.6 Metodický postup extrakce totálních proteinů**

Kvůli minimalizaci přítomnosti zřejmě nejabundantnějšího proteinu na světě ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (Rubisco), jehož abundance může vést k překrytí méně abundantních proteinů, bylo použito k získání proteinové frakce pletivo z odnožovacích uzlů. Vítámvás *et al.* (2012) uvádí, že odnožovací uzly jako nefotosyntetické pletivo obsahují vysoké množství meristemických buněk a nízké množství chloroplastových proteinů jako například malého (20 kDa) a velkého (60 kDa) řetězce Rubisca. Postup extrakce totálních proteinů byl použit podle Wang *et al.* (2003).

Složení všech použitých roztoků je uvedeno v Příloze č. 2.

1. Vysterilizované a předchlazené třecí misky s tloučky důkladně vychladit tekutým dusíkem.
2. Vhodit cca 200 mg vzorku do tekutého dusíku v třecích miskách a důkladně rozetřít na naprosto homogenní jemný prášek.
3. Resuspendovat vzniklý jemný prášek v 2 ml acetonu.
4. Přenést pipetou vzorek do 2 ml mikrozkušavek.
5. Důkladně zvortexovat po 30 s a centrifugovat 3 min při 12 000 g (4 °C).
6. Vzniklou peletu dvakrát promýt acetonem a vždy centrifugovat 3 min při 12 000 g (4 °C).
7. Peletu vysušit při pokojové teplotě.



8. Peletu čtyřikrát promýt ledovou 10% trichloroctovou kyselinou (TCA) v acetonu (dokud není supernatant bezbarvý).
9. Peletu třikrát promýt ledovou 10% TCA ve vodě.
10. Peletu třikrát promýt ledovým 80% acetonem.
11. Vysušit peletu přes noc při pokojové teplotě.
12. Vzorky mohou být uchovávány při -80 °C.

Po každém promývacím kroku musí být peleta vždy kompletně resuspendována důkladným zvortexováním a následně provedena centrifugace 3 min při 12 000 g (4 °C).

13. Resuspendovat suché pelety v 0,5 ml SDS pufru a 0,5 ml fenolu (pufrován Tris – pH 8).
14. Důkladně zvortexovat (až 1 hod při pokojové teplotě) a centrifugovat 3 min při 12 000 g.
15. Odpipetovat svrchní fenolovou fázi do nové 2 ml mikrozkušavky.
16. Přidat k fenolové fázi pět objemových jednotek (ledového) acetonu s 0,1 M amonium-acetátu a ponechat 30 min při -20 °C.
17. Centrifugovat 10 min při 12 000 g a peletu promýt třikrát (ledovým) metanolem s 0,1 M amonium-acetátem.
18. Promýt peletu třikrát (ledovým) 80% acetonem.
19. Peletu vysušit přes noc při pokojové teplotě a dále rozpustit v lyzačním pufru.

#### **4.6.1 Rozpuštění totálních proteinů v lyzačním pufru**

1. Ke každému vzorku napipetovat 100 – 150 µl lyzačního pufru.
2. Vortexovat do úplného rozpuštění proteinové pelety a stočit na stolní centrifuze.

#### **4.6.2 Úprava pH**

V případě potřeby je nezbytné upravit pH roztoku proteinů umístěných na ledu pomocí 50 mM NaOH na ideální hodnotu pro 2D-DIGE pH 8 – 9 (pH 8,5).

#### **4.6.3 Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena pomocí 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

#### **4.6.4 Rekonstituce barviček CyDye™**

1. Vytemperovat barvičky CyDye™ DIGE Fluors (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) při pokojové teplotě po dobu 5. minut.
2. Přidat 5 µl dimethylformamidu a 30 s vortexovat.
3. Centrifugovat zkumavky při 20 000 g po dobu 30 s.
4. Přepipetovat všechn objem do 0,5 ml zkumavek umístěných na ledu.

#### **Barvení vzorků (provádět na ledě)**

1. Do 0,5 ml zkumavek napipetovat objem odpovídající 30 µg proteinů.
2. Od každého vzorku napipetovat do zkumavky objem odpovídající 15 µg proteinů (interní standard - IS). Celkový objem IS/počet gelů = nanáška IS na 1 gel.
3. Umístit barvičky i vzorky na led.
4. Na stěnu zkumavky se vzorkem nanést 0,6 µl příslušné barvičky CyDye (working solution) a opatrně umístit zkumavku do vychlazené centrifugy.
5. Do zkumavky s IS nanést na stěnu daný objem Cy2 (neumíst'ovat do centrifugy!).
6. Spustit centrifugu a zároveň zvortexovat zkumavku s IS.
7. Poté, co centrifuga dosáhne 10 tis otáček, zastavit centrifugaci.
8. Vzorky zvortexovat.
9. Vzorky stočit.
10. Barvení probíhá 30 minut na ledě.

#### **4.6.5 STOP barvení**

1. 15 minut před ukončením barvení vzorků nanést na stěnu zkumavek 1 µl 10 mM lyzinu. Do IS dle počtu gelů, tj. při 6 gelech 6 µl 10 mM lyzinu.
2. Centrifugovat a zároveň zvortexovat zkumavku s IS.
3. Poté, co centrifuga dosáhne 10 tis otáček, zastavit centrifugaci.
4. Vzorky zvortexovat a centrifugovat na stolní centrifuze.

#### **Smíchání vzorků**

Dle předem vytvořeného schématu smíchat vždy dva vzorky (Cy3 + Cy5), které budou fokusovány na jednom IPG stripu, resp. separovány na jednom gelu. K těmto smíchaných vzorkům přidat alikvotní množství IS (Cy2).

#### **4.6.6 Rehydratace IPG stripů s imobilizovaným pH gradientem**

1. Do rehydratačního pufru (RP) přidat trochu bromfenolové modři a následně vyrovnat odstín u všech zkumavek s RP.
2. Do každé zkumavky se vzorky (Cy2, 3, 5) přidat daný objem RP a ampholyt Bio-Lyte (Bio-Rad) tak, aby celkový objem činil 450  $\mu$ l. Objem pro rehydrataci IPG stripů je součtem objemu vzorku + 4,5  $\mu$ l Bio-Lyte + RP.
3. Zvortexovat a krátce centrifugovat.
4. Rehydratační směs (450  $\mu$ l) napipetovat souvislou vrstvou do komůrky fokusačního přístroje mezi obě elektrody.
5. Sundat z IPG stripů (ReadyStrip<sup>TM</sup> IPG Strips, 24 cm, pH 4-7, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) plastový kryt a umístit jej do fokusační komůrky tak, aby po jeho celé délce bylo přiměřeně stejné množství vzorku.
6. Zalít cca 4 ml minerálního oleje a nastavit parametry rehydratace.
7. Fokusační komoru přikrýt alobalem a rehydratovat 16 hodin (barvičky CyDye jsou termolabilní, proto je nezbytné minimalizovat vystavení obarvených vzorků světlu).

#### **4.6.7 Izoelektrická fokusace**

1. Po skončení rehydratace podložit konce IPG stripů filtračním papírem (paper wicks) navlhčeným 10  $\mu$ l deionizované vody.
2. Nastavit parametry fokusace provedenou v Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), s max napětím 10 000 V dokud není dosaženo 75 000 Vhodin.

#### **4.6.8 Příprava 12,5% akrylamidových gelů**

Viz Příloha č. 2 (nutno odstranit vzduch z roztoku akrylamidu za pomoci vývěvy).

#### **Sestavení polymerační cely, nalití a polymerizace gelů**

1. Dokonale umýt elektroforetická skla, nasadit těsnění.
2. Přidat do 12,5% akrylamidového gelu 6 ml 10% amonium persulfátu – APS (zdroj volných radikálů, které iniciují polymeraci) a 0,83 ml N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (reaguje s látkami, které by jinak mohly vychytávat volné radikály).
3. Promíchat a nalít gel do polymerační cely. Hladina gelu by měla být cca 1 cm pod okraj.
4. Napipetovat cca 5 ml water-saturated butanol do každého gelu a nechat polymerovat.

5. Po polymerizaci gelů rozdělat gel caster, odříznout po stranách skel gel, který přečnává a stříčkou s destilovanou vodou opláchnou skla.

#### **4.6.9 Ekvilibrace IPG stripů – redukce a alkylace thiolových skupin**

1. Pokud byly IPG stripy po fokusaci zamražené, je nezbytné nechat je 10 minut temperovat při pokojové teplotě.
2. Vytemperovat ekvilibrační pufr (60 ml) při pokojové teplotě, rozdělit na poloviny a do 30 ml přidat 600 mg DTT, do 30 ml přidat 750 mg jodacetamidu (IAA).
3. Napipetovat 5 ml ekvilibračního pufru s 2% DTT na každý IPG strip umístěný v ekvilibrační destičce.
4. 15 minut třepat, zakrýt alobalem.
5. Ekvilibrační pufr s DTT vylít a napipetovat na každý IPG strip 5 ml 2,5% IAA
6. 15 minut třepat, zakrýt alobalem.
7. Ekvilibrační pufr s IAA vylít.

#### **4.6.10 Příprava elektroforetické cely**

Z celkového objemu 4,5 l anodového running pufru se 200 ml odlije do odměrného válce, zbytek (4,3 l) nalít do elektroforetické cely a zapnout oběh.

#### **Nanášení IPG stripů na gely**

1. IPG stripy důkladně namočit v 1x running pufru v odměrném válci.
2. Odsát tekutinu mezi elektroforetickými skly na jednotlivých gelech za pomoci proužků filtračních papírů.
3. Ekvilibrované IPG stripy umístit pinzetami na vrch 12,5% polyakrylamidového gelu a zalít tekutým 0,5% agarosovým gelem.

#### **4.6.11 Elektroforetická separace**

Pomocí SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) na vertikálních elektroforézách Ettan DALTsix Large Vertical System (GE Healthcare) vzorky rozdělit v druhém směru, tj. podle molekulové hmotnosti.

1. Gumové těsnění svrchního krytu, který drží skla namočit v running pufru a nalít 3x katodový pufr.
2. Vyrovnat hladiny katodového a anodového pufru v elektroforetické cele.
3. Napojit externí chlazení.

4. Nastavit parametry separace, 1. krok – 15 mA/1,5 mm gel (6 gelů = 90 mA), 1 hodina;  
2. krok – 18 mA/1,5 mm gel (6 gelů = 108 mA), 15 – 17 hodin (až čelo doputuje na konec gelu). Pokud separujeme přes den, lze elektrický proud zvýšit na 40 mA/gel (6 gelů = 240 mA). Chlazení nastavit na 17 °C.

#### **Zpracování a digitalizace gelů.**

1. Po skončení elektroforézy se skla vyndají ze stojanu, opláchnou destilovanou vodou od SDS a jednotlivá skla jsou prokládána vlhčenými filtračními papíry a nakonec překryta potravinářskou fólií a alobalem, tak aby nedošlo k vyschnutí gelů či jejich dlouhodobějšímu vystavení světlu.
2. Skla s gelem jsou poté rozevřeny a gel je za pomoci gel klipsu přenesen do deionizované vody a důkladně opláchnut.
3. Gel je přenesen na skenovací sklo laserového skeneru Molecular Imager PharoFX Plus systém (Bio-Rad) a je digitalizován.
4. Snímky gelů byly analyzovány 2-DE softwarem PDQuest Advanced version number 8.0 (Bio-Rad).
5. Gely mohou být uchovávány v 5% roztoku kyseliny octové.

#### **4.7 Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty**

Cílem této části práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pěstování rostlin ječmene (*Hordeum vulgare* L.) pro následné studie hodnocení suchovzdornosti a dále detailně popsat expresi stresových proteinů dehydrinů, v závislosti na míře aplikovaného stresu.

V experimentu byly analyzovány rostliny jarního ječmene odrůdy Amulet, které byly pěstovány ve třech testovaných variantách lišících se obsahem vody v půdě. Tím byl bezprostředně ovlivňován stupeň stresové zátěže (sucho) a následně vodní stav rostlin.

Od fenologické fáze 1. pravého listu byla aplikována diferencovaná zálivka a tím od sebe byly odlišeny tři pokusné varianty – a) „exS“ – 35 % PVK, b) „S“ – 40 % PVK, c) „K“ – 65 % PVK (tabulka č. 5). Rostliny ječmene byly pěstovány v regulovaných podmínkách skleníku VÚRV, v.v.i. za teploty 20 °C, při fotoperiodě 16/8.

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

Tabulka č. 5: Schematické znázornění pokusu – vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty – I. odběr

Varianta pokusu	Počet dnů kultivace za stanovené PVK	Fenofáze při aplikaci diferencované zálivky	Fenofáze při odběru I. vzorku
Extra suchá 35 % PVK	15 dnů	1. pravý list	3. pravý list
Suchá 40 % PVK	21 dnů		
Kontrolní 65 % PVK	25 dnů		

Listové pletivo bylo odebíráno ze třetího plně vyvinutého listu rostlin po 35 dnech růstu. Po 1. odběru vzorků byla vyrovnána objemová vlhkost u všech testovaných variant na 50 % PVK (tzv. rehydratace) a jednotlivé varianty byly ponechány 6 dní bez zálivky. 42. den od vysazení klíčenců byl proveden 2. odběr vzorků stejným způsobem popsáním výše. Kódování jednotlivých variant je složeno z písmen „K“ – kontrola, „S“ – sucho, „exS“ – extra sucho, přičemž 2. odběr je v názvu varianty označen římskou číslicí II (tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Schematické znázornění pokusu – vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty – II. odběr

Varianta	Konec pokusu	Počet dnů kultivace za stanovené PVK	Fenofáze při aplikaci diferencované zálivky	Fenofáze při odběru II. vzorku
Extra sucho 50 % PVK	30 % PVK	6 dnů	3. pravý list	3. pravý list
Sucho 50 % PVK				
Kontrola 50 % PVK				

### 4.8 Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání

V experimentu byly analyzovány rostliny ječmene odrůdy Amulet. Poté co rostliny dosáhly fenologické fáze 1. pravého listu, byl pěstební substrát dosycen na hladinu 80 % PVK. Od tohoto bodu nebyly rostliny zalévány a ve zvolených intervalech byly odebírány vzorky listového pletiva k analýzám, a to a) 1. den po zálivce, což bylo považováno za kontrolní variantu „K“, b) 5. den, c) 8. den, d) 12. den po zálivce. V tento den byl pěstební

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

substrát saturován na 40 % PVK a následně byly odebrány poslední vzorky e) 15. den – „recovery“ (tabulka č. 7).

*Tabulka č. 7: Schematické znázornění pokusu - testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání*

Vzorky	Počáteční stupeň vlhkosti substrátu	Stupeň vlhkosti substrátu při odběru	Počet dnů kultivace	Fenofáze při odběru
<b>Kontrola</b>	80 % PVK	80 % PVK	1 den	1. pravý list
<b>5. den</b>		47 % PVK	5 dnů	2. pravý list
<b>8. den</b>		40 % PVK	3 dny	2. pravý list
<b>12. den</b>		35 % PVK	4 dny	3. pravý list
<b>15. den</b>	40 % PVK	40 % PVK	3 dny	3. pravý list

### **4.9 Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení půdy vodou a náhlého vysychání**

V rámci tohoto pokusu bylo testováno sedm odrůd ječmene, a to syrské krajové odrůdy Er a Tadmor a dále pak nizozemská odrůda Jersey a české odrůdy Malz, Tolar, Amulet a Akcent.

Naklíčené obilky byly vysety do pěstebního substrátu s vlhkostí 55 % PVK, která byla udržována po 9. dnů až do fenofáze 1. pravého listu rostlin. Poté byla aplikována diferencovaná záливka, čímž byly od sebe odlišeny dvě pokusné varianty a) stresovaná „S“ – 30 % PVK a b) kontrolní „K“ – 65 % PVK (tabulka č. 8).

*Tabulka č. 8: Schematické znázornění pokusu – testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – I. odběr*

Varianta	Počet dnů kultivace za stanovené PVK	Fenofáze při aplikaci diferencované záливky	Fenofáze při odběru I. vzorku
<b>Sucho 30 % PVK</b>	11 dnů	plně vyvinutý 1. list	2. pravý list
<b>Kontrola 65 % PVK</b>	16 dnů		

První vzorky listového pletiva byly odebrány 16 dnů po aplikaci diferencované záливky, přičemž rostliny byly ve stádiu 2. pravého listu. Bezprostředně po odběru prvních vzorků byla vlhkost substrátu vyrovnána na 48 % PVK a rostliny byly po 7 dnů ponechány ve

vysychajícím substrátu. Poté byly odebrány druhé vzorky listů, přičemž se rostliny nacházely ve stádiu 3. pravého listu (tabulka č. 9).

*Tabulka č. 9: Schematické znázornění pokusu – testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – II. odběr*

Varianta	Konec pokusu	Počet dnů kultivace	Fenofáze při aplikaci diferencované záливky	Fenofáze při odběru II. vzorku
<b>Sucho</b> <b>48 % PVK</b>	32 % PVK	7 dnů	2. pravý list	3. pravý list
<b>Kontrola</b> <b>48 % PVK</b>				

### **4.10 Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu**

V tomto experimentu byly analyzovány rostliny českých odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.) Amulet, Akcent a Malz a syrské krajové odrůdy Tadmor, která je dobře adaptována na sucho. Rostliny Akcentu, Malzu a Tadmoru byly pěstovány ve dvou testovaných variantách, rostliny Amuletu ve třech variantách, lišících se obsahem vody v půdě. Tím byl bezprostředně ovlivňován stupeň stresové zátěže (sucho) a následně vodní stav rostlin.

Od fenologické fáze 2. pravého listu byla aplikována diferencovaná záливka a tím od sebe byly odlišeny pokusné varianty a) extra sucho „exS“ – 30 % PVK, b) sucho „S“ – 34 % PVK a c) kontrolní varianta „K“ – 64 % PVK (tabulka č. 10). Limitní práh 30% nasycení substrátu byl určen na základě stanovení bodu vadnutí, který vymezuje dolní mez vody v půdě využitelné rostlinami. Při bodu vadnutí, který byl stanoven podle Váši (Valla *et al.*, 2004), jsou rostliny nedostatečně zásobeny vodou a trvale vadnou.

Vzorky pro dehydrinové analýzy a doprovodné fyziologické charakteristiky byly odebrány ze čtvrtého plně vyvinutého listu.

Pro analýzy 2-D-DIGE byl v rámci tohoto pokusu odebrán biologický materiál ve formě odnožovacích uzlů z rostlin odrůdy Amulet, které byly pěstovány za stejných podmínek jako rostliny, z nichž byly odebrány vzorky k dehydrinovým a fyziologickým analýzám.



*Tabulka č. 10: Schematické znázornění pokusu – testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu (pro DIGE analýzy bylo odebíráno pletivo z odnožovacích uzlů)*

Varianta	Počet dnů kultivace za stanovené PVK	Fenofáze při aplikaci diferencované zálivky	Fenofáze při odběru I. vzorku
<b>Kontrola 64 % PVK</b>	15 dnů	plně vyvinutý 2. list (objevuje se 3. pravý list)	4. pravý list
<b>Sucho 34 % PVK</b>	10 dnů		
<b>Extra sucho 30 % PVK (jen Amulet)</b>	10 dnů		

#### 4.11 Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha

V tomto experimentu bylo hodnoceno pět odrůd ječmene – Tadmor (syrská krajová odrůda), české odrůdy Amulet, Bojos a Malz a nizozemská Jersey. Obilky ječmene byly vysety na jaře 2009. Každá odrůda byla vyseta do 6 nádob o objemu 8 l (9 rostlin/nádob). Nádoby byly umístěny pod zahradní přístřešek v areálu Mendelovy univerzity v Brně, což umožňovalo regulovat zálivku. Po výsevu byla v celém experimentu udržována vlhkost na 75 % PVK. Po čtyřech týdnech byl u poloviny nádob zaveden režim omezené zálivky, což znamenalo 30 % PVK, a tento stav byl udržován až do konce vegetace. Ostatní podmínky zůstaly závislé na ročním období a aktuálním počasí (délka dne, teplota, vlhkost vzduchu). Odběr vzorků byl realizován a) 14 dnů po omezení zálivky v růstové fázi počátku metání a b) 26 dnů po omezení zálivky ve fázi metání až začátek kvetení (tabulka č. 11). Z každého květináče byly odebírány směsné vzorky listů.

Z důvodu nedostatku biologického materiálu byly vyhodnoceny jen 2 biologické replikáty, proto nemohla být použita ANOVA.

*Tabulka č. 11: Schematické znázornění pokusu – Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha*

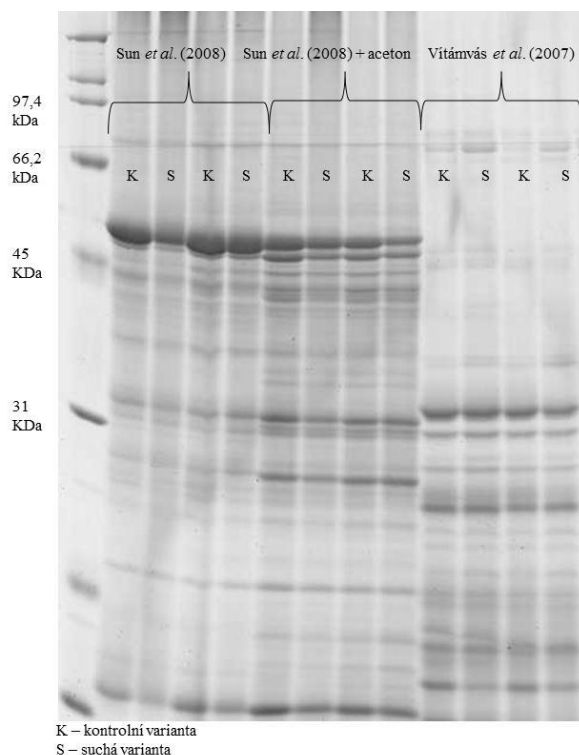
Varianta	Počet dnů od aplikace diferencované zálivky – I. odběr	Počet dnů od aplikace diferencované zálivky – II. odběr	Fenofáze při odběru I. vzorků	Fenofáze při odběru II. vzorků
<b>Sucho 30 % PVK</b>	14 dnů	26 dnů	začátek metání	začátek kvetení
<b>Kontrola 75 % PVK</b>				

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Optimalizace izolace frakce bohaté na dehydriny

Výsledky použití různých extrakčních postupů pro získání proteinové frakce využitelné v dehydrinových analýzách přímo zobrazuje elektroforeogram na obrázku č. 10. Je zřetelné, že varem, který je používán v postupu podle Vítámvás *et al.* (2007), lze dosáhnout jiného elektroforetického profilu, než u postupu podle Sun *et al.* (2008) nebo jeho modifikace. Je pravděpodobné, že silný band o velikosti mezi 45 kDa a 66 kDa, který je nejabundantnějším proteinovým proužkem výsledku extrakce dle Sun *et al.* (2008), u extrakce dle Vítámvás *et al.* (2007) téměř chybí. Lze to vysvětlit tím, že proteiny této frakce jsou termolabilní a byly varem vysráženy. Dle dostupné literatury by se mohlo jednat o subjednotky ribulosa-1,5bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (Rubisco), který je složen z 16 proteinových subjednotek – 8 kopií malých podjednotek (SSU) a 8 kopií velkých podjednotek (LSU) Raikhel *et Chrispeels* (2000).

Obrázek č. 10: Elektroforeogram různých metod extrakcí dehydrinové frakce

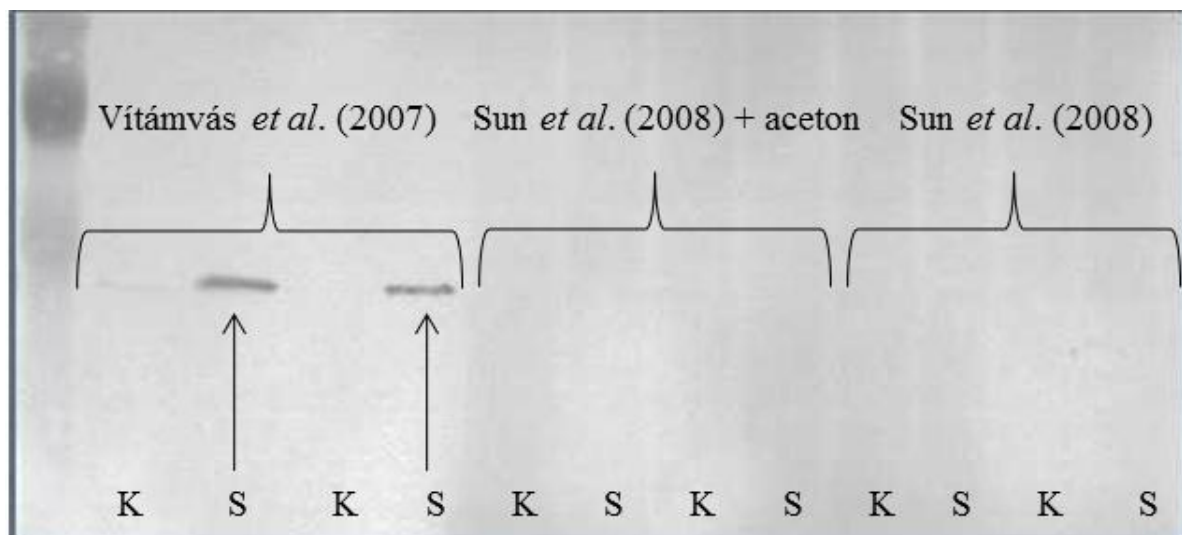


Výsledky vizualizace dehydrinových proteinů za pomoci imunologické metody navázání primární protilátky na antigenní determinantu dehydrinových proteinů, tzv. K segment, jsou patrné z obrázku č. 11. K segment je jedinou vždy přítomnou konzervovanou

doménou, skládající se z 15. aminokyselinových zbytků a v dehydrinech se vyskytuje od 1 do 11 kopií (Choi *et al.*, 1999), na kterou se vážou polyklonální protilátky využívané při detekci dehydrinů (Close *et al.*, 1993).

Na obrázku imunoblotu č. 11 je patrné, že dehydrinové proteiny byly detekovány jen u vzorků suché varianty, které byly extrahovány dle metody Vítámvás *et al.* (2007).

Obrázek č. 11: Srovnání různých metod extrakce dehydrinové frakce na imunoblotu



K – kontrolní varianta

S – suchá varianta

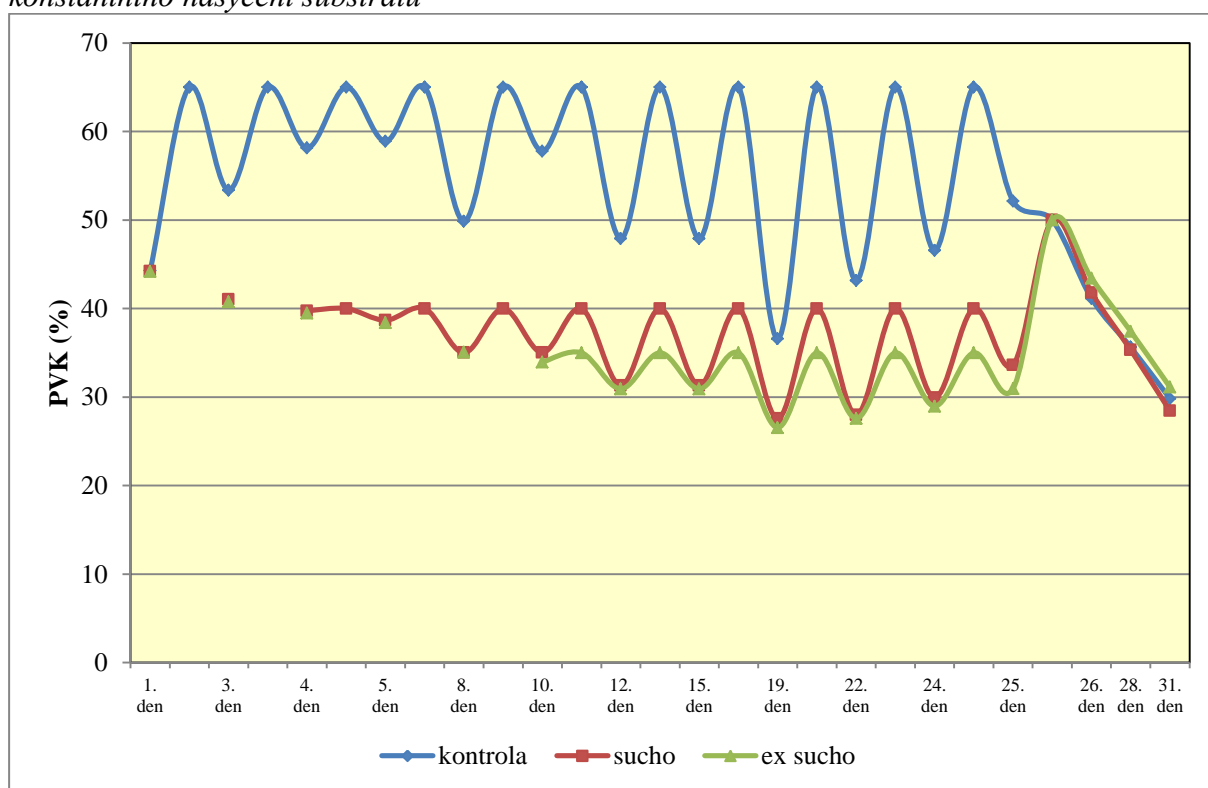
Z výsledků tohoto experimentu, který měl posoudit dvě různé metody extrakce dehydrinových proteinů, vč. jedné modifikace, bylo dospěno k jednoznačnému závěru, že nebyly potvrzeny výsledky extrakce dehydrinové frakce popisované Sun *et al.* (2008) a z tohoto důvodu bylo přistoupeno k aplikaci metody extrakce dehydrinových proteinů podle Vítámvás *et al.* (2007). Tuto metodu extrakce lze charakterizovat jako velmi hodnověrnou, byť oproti metodě dle Sun *et al.* (2008) jako pracnější.

## **5.2 Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty**

Tento experiment měl explorativní charakter ve smyslu, nalézt a optimalizovat vhodný systém pěstování rostlin pro studium suchovzdornosti v regulovaných podmínkách. Rostliny byly pěstovány za třech odlišných vlhkostních podmínek. Průběh vlhkosti substrátu znázorňuje graf na obrázku č. 12. Za první den pokusu je označen den, kdy byla započata diferencovaná závlivka, čímž byly od sebe odlišeny tři testované varianty – a) „exS“ – 35 % PVK, b) „S“ – 40 % PVK a c) „K“ – 65 % PVK. Již 4. den od diferencované závlivky bylo

možno pozorovat rozdíly v růstu mezi kontrolní variantou a variantami stresovanými. Stresované varianty se na požadovanou úroveň půdní vlhkosti dostaly až čtvrtý den (suchá varianta), resp. desátý den (extra suchá varianta). První odběr vzorků se uskutečnil 25. den po aplikaci diferencované závlivky. Rostliny suché varianty byly tedy na požadované úrovni půdní vlhkosti kultivovány 21 dnů, zatímco rostliny extra suché varianty jen 15 dnů. Po odběru prvních vzorků byla vyrovnána půdní vlhkost všech variant na 50 % PVK a za 6 dnů byly odebrány druhé vzorky. Z obrázku č. 12 je vidět, že půdní vlhkost při odběru druhých vzorků byla shodně na úrovni kolem 30 % PVK.

Obrázek č. 12: Graf průběhu půdní vlhkosti při dlouhodobějším pěstování rostlin za konstantního nasycení substrátu

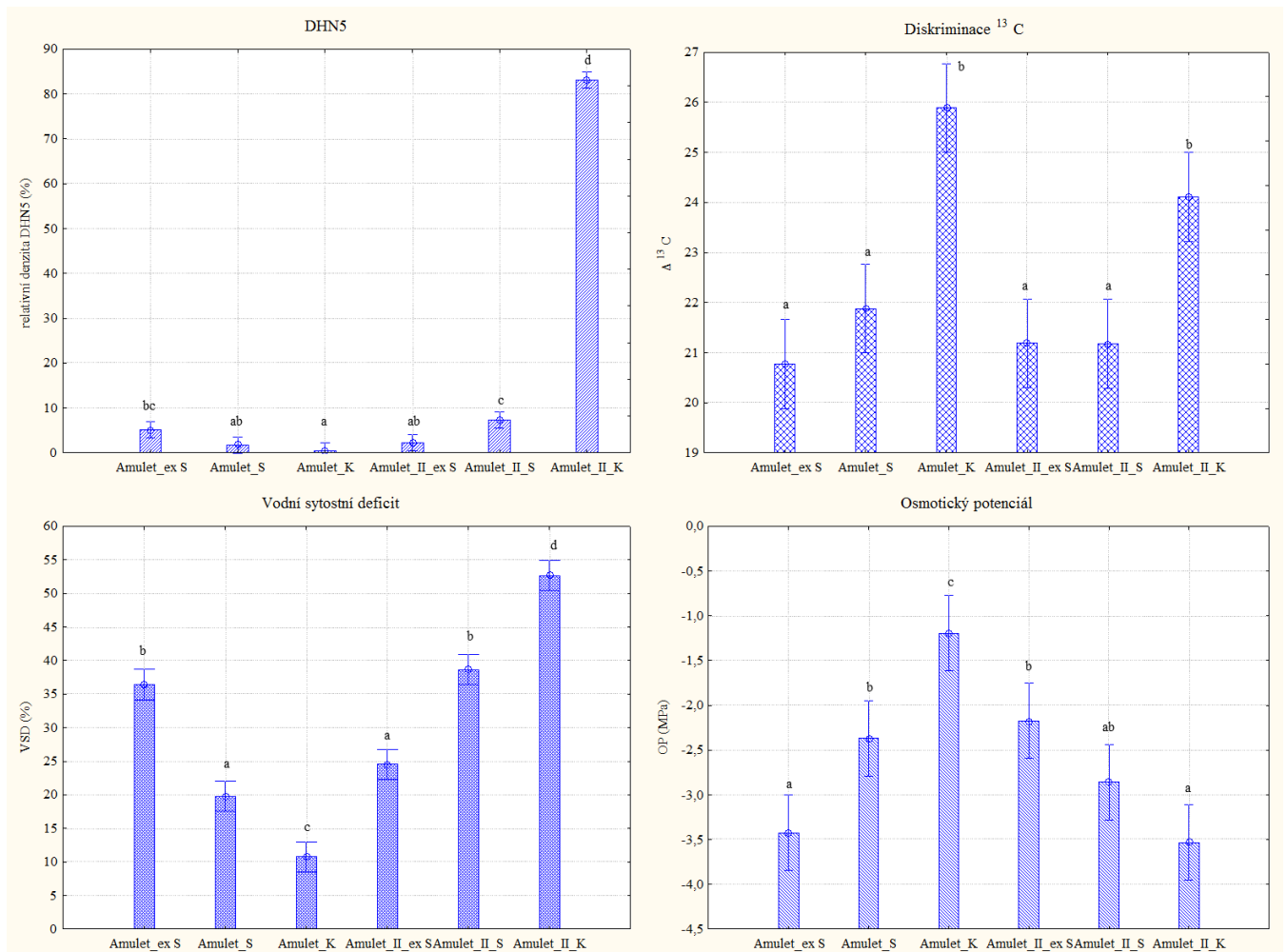


Práce Chen *et* Murata (2002) uvádí, že typickou reakcí rostliny na stavy spojené s dehydratací je mimo jiné syntéza nízkomolekulárních vysoce rozpustných látek typu betainu, prolinu, nazývané jako kompatibilní soluty. Osmotické přizpůsobení tkví ve snížení osmotického potenciálu, který představuje nejdůležitější složku vodního potenciálu, který je považován za základní pojeň vodního režimu rostlin. Minimální (nejbližší nule) hodnota osmotického potenciálu je dána minimem rozpuštěných iontů, proteinů a ostatních metabolitů v živé buňce.

Lze tedy očekávat negativní korelaci mezi obsahem vody v rostlině vyjádřeným jako vodní sytostní deficit (VSD) a koncentrací kompatibilních solutů vyjádřenou jako osmotický potenciál (OP). Práce Beck *et al.* (2007), uvádí, že ztráta vody z buněk je spouštěcím mechanismem pro syntézu osmoticky aktivních látek tzv. osmoprotektantů. Tento fenomén je považován za jeden z nejčastějších a nejběžnějších obranných mechanismů rostlin při stresech asociovaných s dehydratací buněk.

VSD varianty Amulet\_exS dosahoval hodnot téměř 37 %, proto tyto rostliny snížily syntézou osmoprotektivních látek svůj osmotický potenciál až na hodnotu -3,4 MPa, byť je to pro jejich metabolismus zatěžující. Naproti tomu metabolismus rostlin kontrolní varianty, jejichž průměrný VSD dosahoval hodnot kolem 11 %, syntetizoval kompatibilní soluty jen v minimálním množství, kterému odpovídala hodnota osmotického potenciálu -1,2 MPa (obrázek č. 13).

Obrázek č. 13: Průměrná akumulace DHN5, diskriminace  $^{13}\text{C}$ , vodní sytostní deficit a osmotický potenciál odrůdy Amulet – modifikováno z Škodáček *et al.*, (2010)



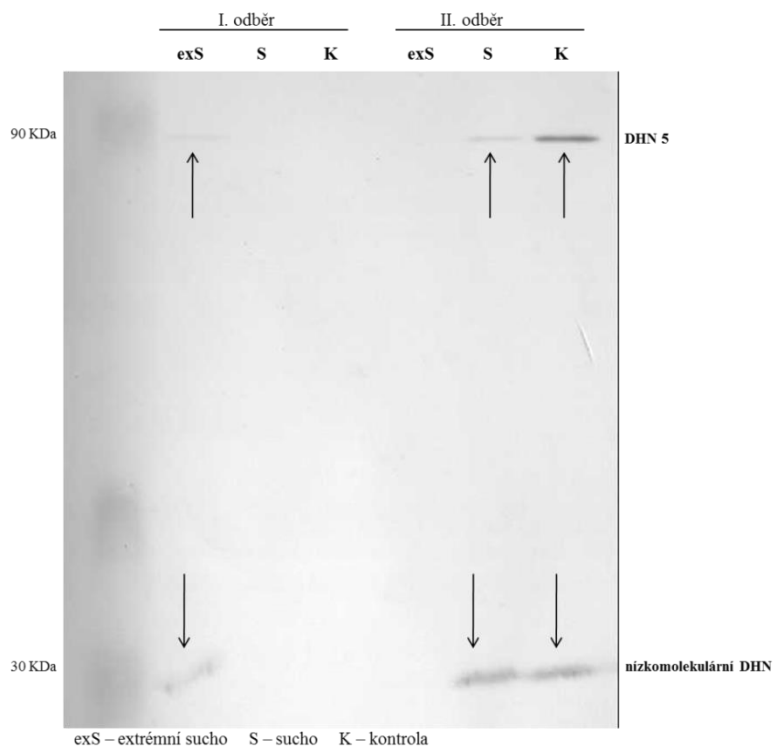
Pomocí izotopové diskriminace  $^{13}\text{C}$  (obrázek č. 13) byla statisticky signifikantně odlišena varianta „exS“ a „K“ a „S“ a „K“, nicméně statisticky prokazatelný rozdíl nebyl zaznamenán mezi variantou „exS“ a „S“. Po vyrovnání hladiny vlhkosti u jednotlivých variant (2. odběr) byla prokázána statisticky významná diference jen mezi variantou „II\_K“ a zbylými dvěma variantami (ty od sebe odlišeny nebyly). Z grafu na obrázku č. 13 je patrné, že rostliny pěstované za nejvyšší zátěže suchem (Amulet\_exS) nejméně diskriminovaly izotop  $^{13}\text{C}$  a tedy nejlépe využívaly dostupné vody a zabudovaly do organických sloučenin svých těl více uhlíku na jednotku spotřebované vody. Tento parametr stoupal přímo úměrně spolu s množstvím vody, které měla rostlina dostupné při svém růstu a vývoji. Nejvíce diskriminovaly  $^{13}\text{C}$  rostliny kontrolní varianty, protože neměly potřebu významně regulovat výdej vody stomaty a proto byla průduchová vodivost mnohem vyšší, než rychlost fotosyntézy. Zajímavé jsou hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$  u tzv. rehydratovaných variant (2. odběr). Zatímco výsledky obou suchých variant byly v podstatě konzistentní, varianta Amulet\_II\_K poklesla, byť tento pokles nebyl prokázán jako statisticky významný. Rostliny této varianty nebyly aklimatizovány na sucho, a to jak po fyziologické stránce, tak ani po stránce anatomické. Tyto rostliny měly dlouhé čepele listů s velkým množstvím průduchů na plochu listu, což neumožňovalo efektivní a okamžitou regulaci výdeje vody. Toto ilustruje také obsah vody v rostlinách vyjádřený vodním sytostním deficitem. Lze předpokládat, že po vyrovnání hladiny vlhkosti v pěstebním substrátu bude vyrovnán také obsah vody v rostlinách všech variant. Z grafu na obrázku č. 12 je vidět, že pokles obsahu vody v půdě probíhal u všech rehydratovaných variant shodně a při druhém odběru byla vlhkost substrátu prakticky stejná. Obsah vody v rostlinách byl však statisticky významně rozdílný. Zatímco aklimatizovaná varianta Amulet\_II\_exS vykazovala nejnižší ztrátu vody okolo 25 %, varianta Amulet\_II\_K vykazovala VSD skoro 53 %. Od tohoto faktu se odráží i výrazné snížení hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$  Amuletu\_II\_K oproti kontrolní variantě prvního odběru. Rostliny nebyly aklimatizovány na významné hospodaření s vodou prostřednictvím průduchů, kterých měly na listovou plochu více, než varianty pěstované v suchu. Rostliny byly množstvím dostupné vody přinuceny k jejímu efektivnějšímu využití.

V případě stresu suchem byly za pomoci imunoblotu detekovány nejméně dva typy dehydrinů. Prvním z nich je dehydrin se zdánlivou molekulovou hmotností (MW) cca 90 KDa (obrázek č. 14). Vzhledem ke skutečnosti, že dehydriny vykazují zvýšenou afinitu k SDS (sodium dodecylsulfát), na SDS-PAGE gelu (blotu) se potom jeví zdánlivě zvýšenou molekulovou hmotností asi o 24 % (Kosová *et al.*, 2007). S vysokou pravděpodobností se dle velikosti jedná o DHN5 (58,5 KDa) kódovaný genem *Dhn5* lokalizovaným na chromozomu

6H, jehož exprese je někdy popisována jen jako indukovaná chladovým působením (Close *et al.*, 1995).

V tomto experimentu byla detekována mírně zvýšená hladina tohoto dehydrinu (graf na obrázku č. 13) u varianty „exS“. Hladina DHN5 u variant „S“ a „K“ byla na hranici detekovatelnosti a mezi těmito variantami nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Naproti tomu u druhého odběru prudce vzrostla exprese DHN5 u varianty „II\_K“, která nebyla na stres suchem aklimatizovaná, neboť byla v předešlé části experimentu pěstována za optimální vlhkosti. Tento jev je s největší pravděpodobností opět kauzálně spjat s obrannou odpovědí rostliny na postupný nástup stresu suchem. Stejný trend nárůstu DHN5 můžeme sledovat i u varianty „II\_S“. Toto zjištění naznačuje, že akumulace tohoto dehydrinu je zvýšena i za stresu suchem a lze tedy vyvodit závěr, že zvýšená exprese DHN5 je obecně asociována s dehydratací buněk. Na imunoblotech byl/y kromě DHN5 detekován/y také tzv. nízkomolekulární dehydrin/y (obrázek č. 14). Mezi tyto suchem indukovatelné dehydriny jsou podle dostupné literatury řazeny: DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6, DHN7, DHN9, DHN10 a DHN11 s MW od 14,2 do 29,2 KDa. Zdánlivá MW detekovaného dehydrinu/ů byla cca 30 KDa.

Obrázek č. 14: Detekce dehydrinů u ječmene odrůdy Amulet na imunoblotu – modifikováno z Škodáček *et al.*, (2010)



### 5.2.1 Faktorová analýza

K vyšetření vnitřních souvislostí a vztahů čili korelací a odhalení základní struktury matice dat byla využita tzv. faktorová analýza, která je řazena mezi vícerozměrné statistické metody. Tato metoda se týká analýzy struktury vnitřních vztahů mezi velkým počtem původních znaků pomocí souboru menšího počtu latentních proměnných, zvaných faktory. Cílem je tedy zestručnění informace obsažené ve značném počtu původních znaků (v tomto případě DHN5, OP, VSD, <sup>13</sup>C) zdrojové matice dat do menšího souboru latentních proměnných, a to s minimální ztrátou informace.

Standardizace dat v případě faktorové analýzy není nutná, neboť tato metoda vycházející z korelační matice není závislá na měřítku vstupních hodnot.

Korelační matice v tabulce č. 12 znázorňuje těsnost mezi jednotlivými proměnnými. Hodnoty korelačních koeficientů mezi jednotlivými proměnnými, které jsou označeny tučně červeně, jsou na zvolené hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významné. Za signifikantní lze empiricky považovat korelace vyšší než 0,75, které jsou vyznačeny červeně. Podle výsledků korelační matice lze prohlásit, že existuje velmi silná negativní závislost mezi osmotickým potenciálem a vodním sytostním deficitem. Další signifikantní souvztažnost lze pozorovat mezi obsahem dehydrinového proteinu DHN5 a vodním sytostním deficitem, tedy parametrem udávajícím aktuální vodní režim v rostlině. Z korelační matice je tedy vidět, že mezi proměnnými jisté korelace jsou a že je tedy naděje na odhalení nějaké korelační struktury.

*Tabulka č. 12: Korelační matice znázorňující těsnost mezi proměnnými*

	OP	DHN5	<sup>13</sup> C	VSD
OP	1	-0,57748	0,482474	<b>-0,91774</b>
DHN	-0,57748	1	0,337323	<b>0,770829</b>
<sup>13</sup> C	0,482474	0,337323	1	-0,24436
VSD	<b>-0,91774</b>	<b>0,770829</b>	-0,24436	1

Další fází faktorové analýzy je metoda extrakce faktorů. Pro účely této disertační práce byly faktory odhadnuty na základě metody hlavních komponent. Vzniklé faktory jsou pak vlastně hlavními komponentami, ovšem po rotaci faktorů, ke které je přistoupeno i v této práci, již tyto faktory nemaximalizují rozptyl podél os souřadného systému.

Tabulka č. 13 ukazuje vypočtené hodnoty vlastních čísel faktorové analýzy, které lze interpretovat jako celkový rozptyl proměnných (v tomto případě 4) a procento celkového rozptylu, které daný faktor vysvětluje z celkového 100 % rozptylu, např. faktor číslo 1



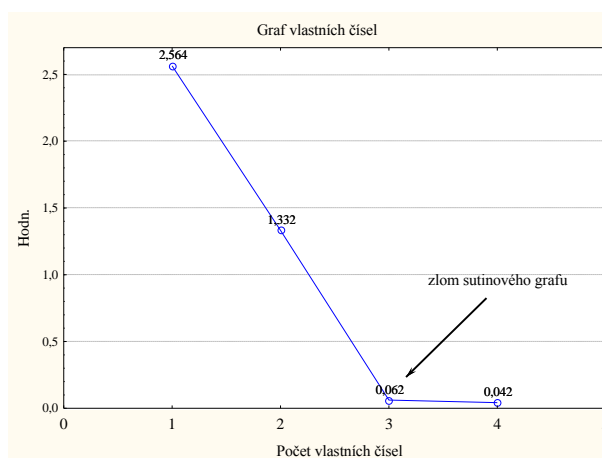
vysvětluje 64 % z celkového rozptylu, vyjádřeno absolutní hodnotou je to 2,56. Celková hodnota faktorů 1 a 2 vysvětluje 97,4 % celkového rozptylu (sloupec kumulativní %).

Tabulka č. 13: Výpočet vlastních čísel faktorové analýzy proměnných

Vlastní číslo – Extrakce: Hlavní komponenty				
Hodn.	Vl. číslo	% celk. rozptylu	Kumulativní vl. číslo	Kumulativní %
1	2,563561	64,08903	2,563561	64,089
2	1,332254	33,30634	3,895815	97,3954
3	0,061817	1,54542	3,957632	98,9408
4	0,042368	1,05921	4	100

Důležité je stanovit kritérium, podle něhož bude ještě poslední nejslabší společný faktor zařazen do výsledného vypočteného modelu faktorové analýzy. Při výpočtu je respektována sestupná priorita významu společných faktorů, tj. první faktor je tedy potom považován za nejsilnější faktor, který vysvětluje maximum z hodnoty rozptylu proměnných, druhý faktor vysvětluje maximum ze zbytku rozptylů nevysvětlených faktorem prvním až po nejslabší faktor, který je ještě zařazen do modelu faktorové analýzy. K určení rozumného počtu faktorů lze použít několik heuristických pravidel. V tomto případě bylo akceptováno empirické pravidlo pokračovat v analýze s tolika faktory, kolik je vlastních čísel větších než 1 (tabulka č. 13). Na počet významných faktorů lze také usuzovat z tzv. sutinového neboli Cattelova indexového grafu úpatí vlastních čísel (obrázek č. 15). Úpatí je definováno jako zlomové místo mezi kolmou stěnou a vodorovným dnem. V tomto případě je významný počet faktorů roven třem.

Obrázek č. 15: Cattelův indexový graf úpatí vlastních čísel



## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

Pro další výpočet bylo tedy uvažováno o dvou faktorech. V další fázi dojde k transformaci faktorů tak, aby byly smysluplně interpretovatelné. Tato fáze se nazývá rotace faktorů a jde v ní o to, aby rotací vznikla tzv. jednoduchá korelační struktura, tedy aby každá vstupní proměnná byla výrazně korelována jen s jedním faktorem. Rotací je dosaženo toho, aby každý faktor byl korelován pouze s určitou skupinou proměnných a korelace s ostatními proměnnými byly nulové.

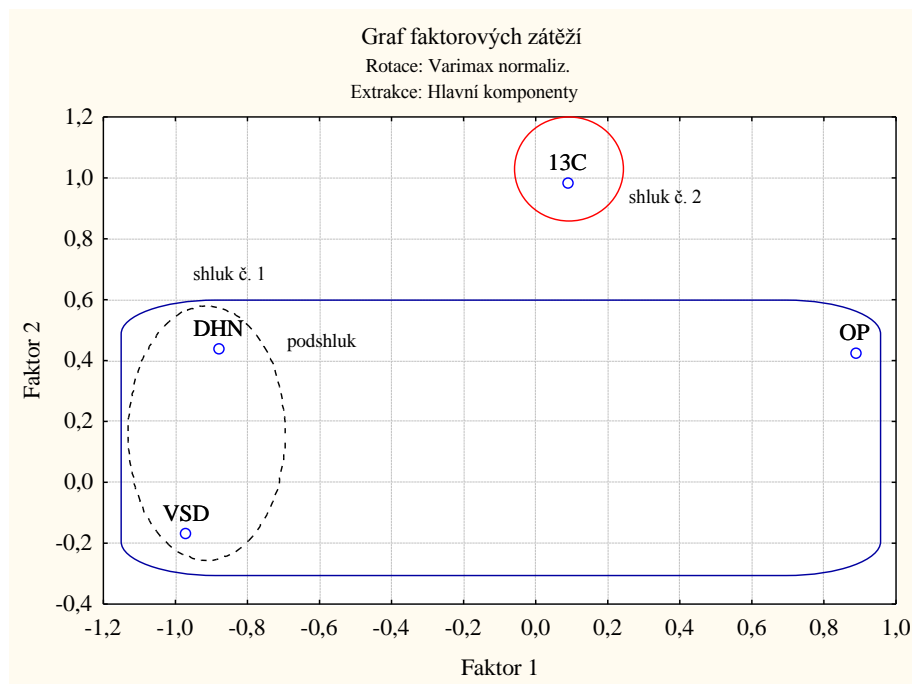
Z faktorových zátěží uvedených v tabulce č. 14 je zřejmá korelační struktura faktorových zátěží. První faktor koreluje s proměnnými osmotický potenciál, obsah DHN5 a vodní sytostní deficit. Druhý faktor významně koreluje s diskriminací  $^{13}\text{C}$ . Lze tedy říci, že faktor č. 1 vytváří třídu tří proměnných, které jsou navzájem úměrné, přičemž proměnná osmotický potenciál je nepřímo úměrná s proměnnými obsah DHN5 a vodní sytostní deficit, které jsou navzájem v přímé korelaci. Podle věcného významu lze tedy faktor č. 1 interpretovat jako stav vodního poměru rostlin krátkodobějšího charakteru, zatímco faktor č. 2 lze zobecnit jako stav vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru.

*Tabulka č. 14: Faktorové zátěže (korelace vstupních proměnných a faktorů)*

<b>Faktor, zátěže (Varimax normaliz. ) Extrakce: Hlavní komponenty</b>		
<b>Proměnná</b>	<b>Faktor 1</b>	<b>Faktor 2</b>
<b>OP</b>	0,885823	0,427894
<b>DHN5</b>	-0,88156	0,441721
$^{13}\text{C}$	0,088144	0,987083
<b>VSD</b>	-0,97285	-0,16502

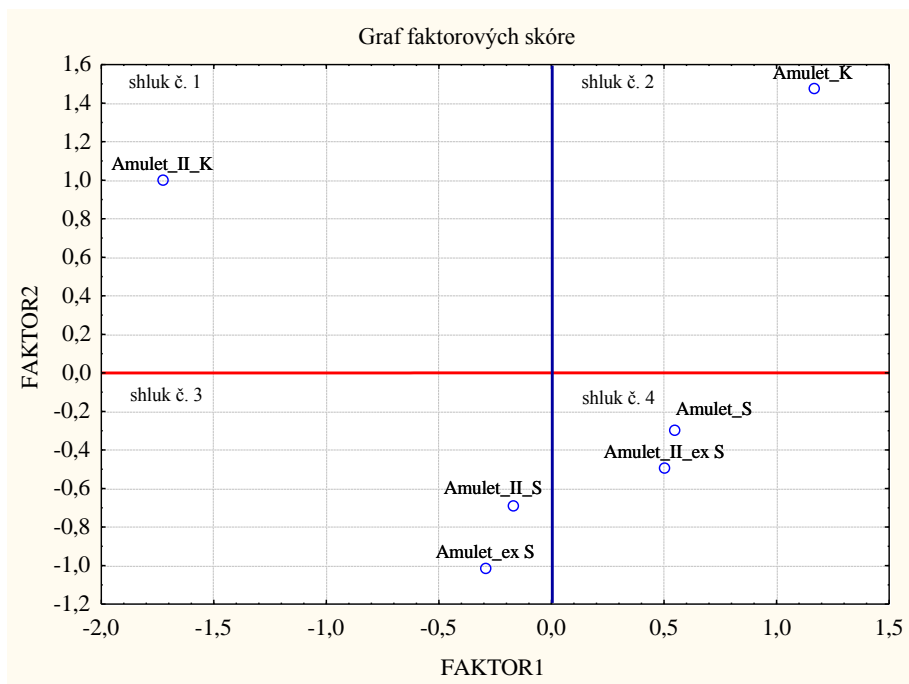
Faktorovou strukturu je možné znázornit i graficky v prostoru faktorových zátěží, když na souřadných osách jsou jednotlivé faktory – v našem případě faktor č. 1 a faktor č. 2. Znaky při konci souřadnicové osy mají vysokou faktorovou zátěž a jsou označovány jako tzv. čisté původní znaky. Z obrázku č. 16 faktorových zátěží lze vypožorovat skutečnost, že všechny původní znaky neboli proměnné mají vysokou faktorovou zátěž, ať již osmotický potenciál, obsah DHN5 a vodní sytostní deficit k faktoru č. 1 (shluk č. 1), nebo diskriminace  $^{13}\text{C}$  (shluk č. 2) k faktoru č. 2. Znaky tedy vytvořily shluky neboli skupiny, které mají vysokou faktorovou zátěž pro stejné faktory. I když znak osmotický potenciál stojí od znaků obsahu DHN5 a vodní sytostní deficit značně daleko, stále tvoří jeden shluk a to z toho důvodu, že mají vysokou zátěž k faktoru č. 1. Vzdálenost znaku osmotický potenciál je vysvětlena opačnou korelací k oběma zbylým znakům ve shluku č. 1.

Obrázek č. 16: Graf faktorových zátěží



Převod jednotlivých pozorování do faktorového prostoru je vlastně výpočtem faktorových skóre pro vstupní případy (obrázek č. 17). Jinými slovy je to výpočet hodnot faktoru č. 1 „stav vodního poměru rostlin krátkodobějšího charakteru“ a faktoru č. 2 „stav vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru“ pro jednotlivé testované varianty rostlin ječmene. I v tomto případě byly vytvořeny určité shluky, a to těmi případy, které se chovají podobně. To znamená, že například shluk č. 3, který obsahuje Amulet\_exS a Amulet\_II\_S, tedy variantu, kde byly rostliny pěstovány v substrátu s udržovanou vlhkostí 35 % PVK a variantu, kde byly rostliny nejprve kultivovány v substrátu s vlhkostí 40 % PVK a poté byly po 6 dnů ponechány bez závlaky. Tyto dvě varianty mají velmi podobné nízké hodnoty faktorových skóre pro faktor č. 1, naopak faktorová skóre pro faktor č. 2 mají obě varianty poměrně vysoké. Toto zjištění lze interpretovat tím způsobem, že stav charakteristik popisující krátkodobější vodní poměry rostlin, tedy obsah DHN5, OP a VSD byl u rostlin v době odběru obou testovaných variant velmi podobný. Co se týče efektivity využití vody, které lze odhadovat na základě parametru  $\Delta^{13}\text{C}$ , lze říci, že lepší účinnost využití vody měly rostliny varianty Amulet\_II\_exS, tyto rostliny získaly více uhlíku na jednotku spotřebované vody. K tomuto závěru je možné dospět z vypočtené vysoké hodnoty faktorové zátěže faktoru č. 2 k  $\Delta^{13}\text{C}$ .

Obrázek č. 17: Graf faktorových skóre



Naopak shluk č. 2 tvoří jen jediný případ, a to Amulet\_K, tedy variantu, v níž byly rostliny pěstovány za plného nasycení substrátu (65 % PVK). Je vidět, že tyto rostliny se na úrovni vodního režimu chovaly zcela odlišně od výše diskutovaného příkladu rostlin ve shluku č. 3. Je to naprosto logické zjištění, neboť tyto rostliny vegetovaly za zcela odlišných vláhových poměrů. Tato varianta má poměrně vysoké faktorové skóre jak pro faktor č. 1, tak i pro faktor č. 2. U těchto rostlin byla průduchová vodivost mnohem vyšší než rychlost fotosyntézy, nepotřebovaly šetřit vodou a  $^{13}\text{C}$  byl při karboxylaci silně diskriminován. Z pohledu účinnosti využití vody využívaly tyto rostliny vodu nejméně efektivně, zcela logicky, neboť jí nepotřebovaly šetřit.

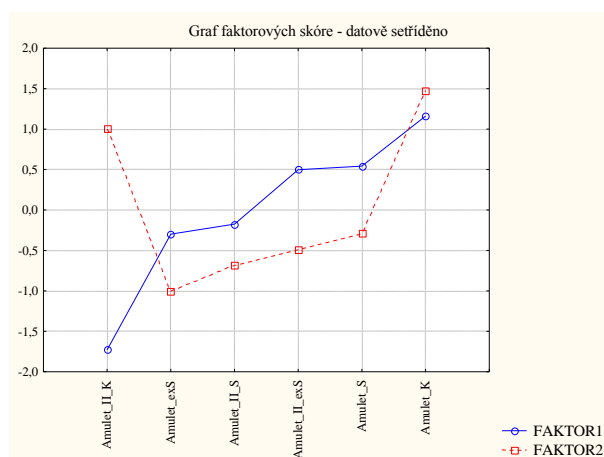
Je zajímavé porovnat chování rostlin ve shluku č. 2 (Amulet\_K) a shluku č. 1 (Amulet\_II\_K). Efektivita využití vody, která je nepřímo úměrná s parametrem  $\Delta^{13}\text{C}$ , a korelovaná s faktorem č. 2, dosahuje u rostlin Amulet\_II\_K nižších hodnot, než u Amuletu\_K. Tato varianta byla tedy z pohledu získání uhlíku na jednotku spotřebované vody účinnější. Je to pochopitelné, neboť rostlina musela s vodou šetřit. Naopak došlo ke zvýšení hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  cukrů oproti variantě Amulet\_K. V účinnosti využití vody mezi oběma variantami došlo sice k signifikantním změnám, nicméně nelze je označit jako diametrální zvrát. Jiná situace je u charakteristik aktuálního vodního stavu rostlin, které jsou korelované s faktorem č. 1. Stav těchto parametrů rostlin Amulet\_K a Amulet\_II\_K jsou v tomto případě

diametrálně odlišné. Rostliny Amulet\_II\_K masivně ztrácely vodu, což byl spouštěč pro syntézu dehydrinových proteinů a pokles osmotického potenciálu.

Na převod pozorování do faktorového prostoru je možno dívat se i jiným způsobem, respektive interpretovat jeho výsledky. Pokud se mezi sebou budou komparovat vždy jen varianty, které byly odebrány v jeden čas, tedy Amulet\_exS, S, K a dále Amulet\_II\_exS, S, K, lze dostat trochu jiný pohled na chování rostlin v jednotlivých variantách. Zatímco rostliny varianty Amulet\_K plývají vodou a hodnoty DHN5 a VSD jsou nejnižší, OP potom nejvyšší, rostliny Amulet\_S už začínají hospodařit s vodou a i stav charakteristik vázajících se k faktoru č. 1 se mění. Chování rostlin ve variantě Amulet\_exS je oproti dvěma předešlým opět rozdílné. Tyto rostliny mají nejnižší míru diskriminace  $^{13}\text{C}$ , proto lze říci, že mají nejvyšší účinnost využití vody. Tento rozdíl však už není tak značný, jako mezi variantami Amulet\_K a Amulet\_S. Je to pochopitelné, neboť tato vlastnost je geneticky determinována a nelze překročit daný biologický strop. Jak lze vidět z obrázku č. 17, rostliny v této variantě se z hlediska chování charakteristik korelovaných k faktoru č. 1, tedy DHN5, OP a VSD, dostaly do druhé poloviny pole grafu, tedy jejich hodnoty v době odběru byly ve srovnání s variantou Amulet\_K negativně reciproční.

Pokud budou jednotlivé vstupní případy datově seříděny podle jejich vzestupných faktorových skóre a promítnuty do faktorového prostoru, potom bude výsledkem graf na obrázku č. 18. Z tohoto grafu je možné vypožorovat určitý trend, kdy s rostoucí hodnotou faktorových skóre faktoru č. 1, roste i hodnota faktorových skóre faktoru č. 2. Výjimka je potom varianta Amulet\_II\_K, která má vysoké faktorové skóre k faktoru č. 2, tedy k  $\Delta^{13}\text{C}$  a nízké faktorové skóre k faktoru č. 1, tedy k charakteristikám aktuálního vodního stavu rostliny. Toto je způsobeno tím, že izotopový signál sušiny se integruje po celou dobu tvorby sušiny, tedy množství  $^{13}\text{C}$ , které bylo zainkorporováno do biomasy během růstu kontrolní varianty Amulet\_K, bylo jakýmsi odrazovým můstkem pro množství izotopu  $^{13}\text{C}$  varianty Amulet\_II\_K.

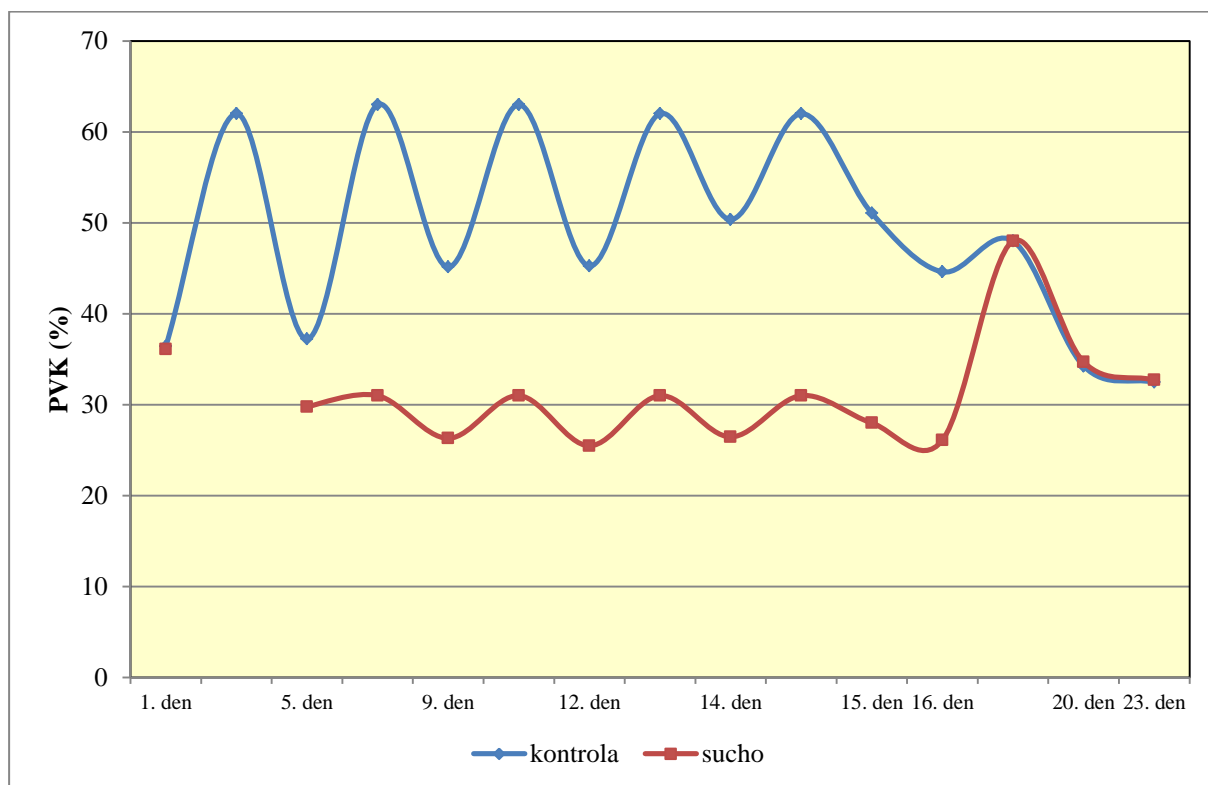
Obrázek č. 18: Datově seříděné vstupní případy experimentu



### 5.3 Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení půdy vodou a náhlého vysychání

Na základě výsledků předešlého experimentu bylo přistoupeno k analýzám reakcí širšího spektra odrůd ječmene za podmínek, které lze označit jako sucho. Z grafu na obrázku č. 19 je patrné, že experiment byl oproti předešlému pokusu mírně modifikován. A to především ve snížení stupně nasycení půdy vodou u stresované varianty na 30 % PVK. Začátek diferencované závlivky, kterou byl bezprostředně ovlivňován stupeň stresové zátěže a samozřejmě také vodní režim rostlin, je v grafu označen jako 1. den, přičemž se rostliny nacházely ve fázi prvního listu a byly vysety 9 dní před aplikací diferencované závlivky. Již 5. den od rozdílné závlivky bylo možno pozorovat rozdíly mezi kontrolní variantou a variantou stresovanou, přičemž suchá varianta dosáhla zvolené úrovně obsahu vody v půdě (30 % PVK) právě 5. den. Rostliny suché varianty byly na úrovni 30 % PVK pěstovány právě 11 dnů do prvního odběru, který byl realizován 16. den. Po prvním odběru vzorků byl obsah vody v půdě obou variant vyrovnán na 48 % PVK a za 7 dnů byl uskutečněn druhý odběr vzorků. Z obrázku č. 19 je patrné, že půdní vlhkost za těchto sedm dní klesla u obou variant na hladinu 32 % PVK.

Obrázek č. 19: Graf průběhu půdní vlhkosti při dlouhodobém pěstování rostlin za konstantního nasycení substrátu



Výsledky průměrného vodního sytostního deficitu, které jsou shrnuty v grafech na obrázku č. 21, ukazují, že tato charakteristika aktuálního vodního stavu rostlin rozlišila statisticky signifikantně některé odrůdy suché varianty, zatímco rozdíl mezi obsahem vody v rostlinách kontrolní varianty byl statisticky nevýznamný a VSD se u nich pohybovalo od 8,6 – 12,8 %. Rostliny pěstované za sucha vykazovaly zcela logicky VSD vyšší, a to od 18 % (Tadmor\_S) do 29 % (Tolar\_S). Pokud k této charakteristice přistoupí osmotický potenciál (obrázek č. 21), je porovnání odrůd zajímavější. Už v kontrolní variantě lze vyzorovat, že statisticky signifikantně se od ostatních odrůd liší odrůda Er\_K, která vykazuje OP -1,6 MPa, zatímco hodnoty ostatních odrůd kontrolní varianty se pohybovaly okolo -1,2 MPa. Za sucha se však některé odrůdy chovaly navzájem odlišně. Nejnižších průměrných hodnot OP dosahovala opět odrůda Er\_S (-3 MPa) společně s Malz\_S (-2,9 MPa). Odrůda Er vykazovala tendenci vždy vyšší stupeň vodního deficitu, což bylo také pokaždé spojeno s mohutnou syntézou osmoprotektantů, vyúsťující v nižší osmotický potenciál. Tato odrůda pochází z původních syrských krajových odrůd a je citlivá vůči suchu. Velmi zajímavé je, že rostliny Tadmoru suché varianty svým VSD odpovídaly odrůdě Er kontrolní varianty. Pokud je vzata v potaz také charakteristika  $\Delta^{13}\text{C}$  (obrázek č. 21) je vidět, že Er za podmínek sucha

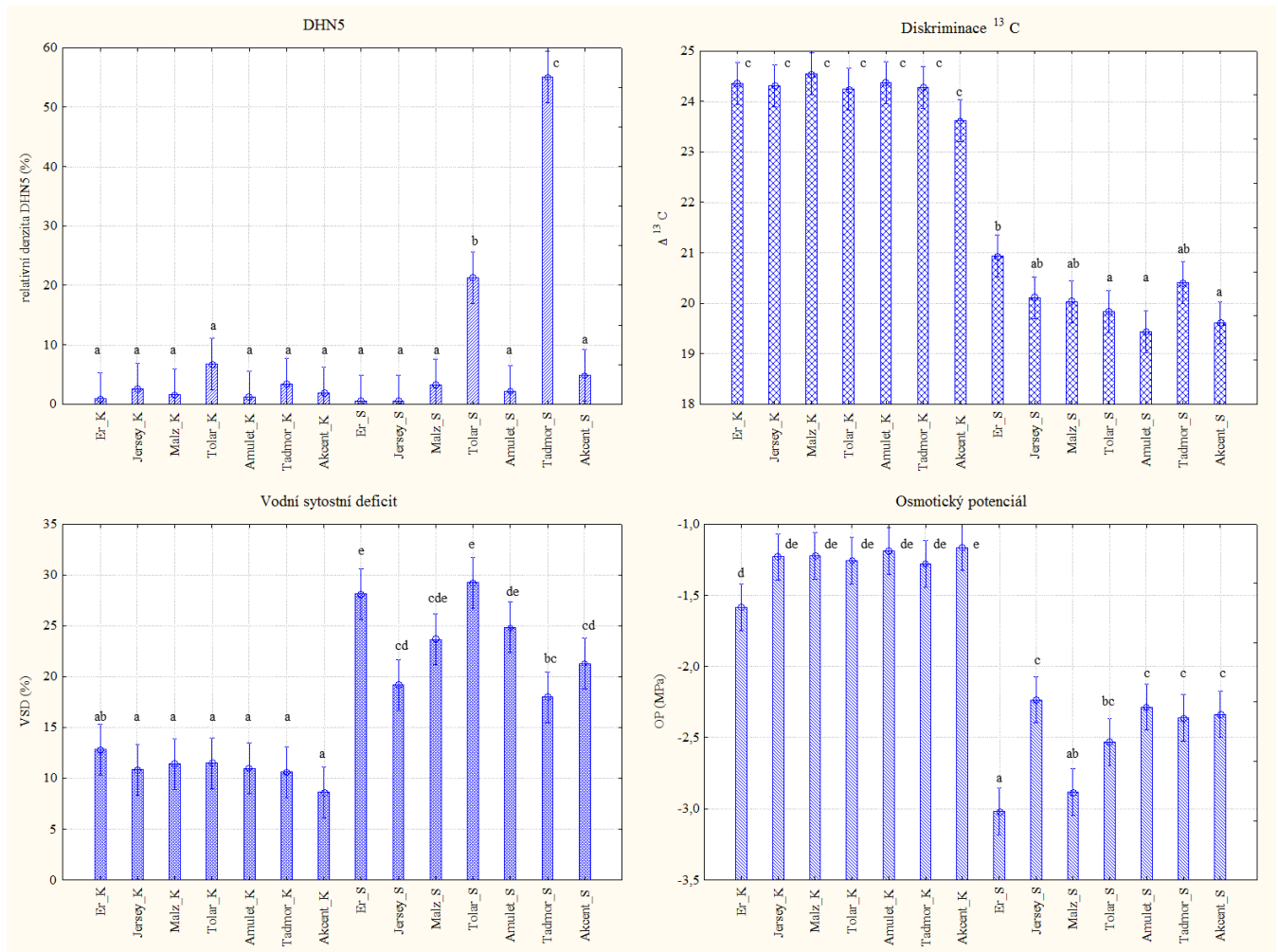
diskriminuje při karboxylaci nejvíce ze všech testovaných odrůd izotop  $^{13}\text{C}$  a tedy průduchová vodivost je mnohem vyšší, než rychlost fotosyntézy. Jinými slovy lze říci, že tato odrůda v porovnání s ostatními testovanými odrůdami nedokáže efektivně regulovat výměnu plynů pomocí průduchů a tedy její hospodaření s vodou není příliš efektivní. Ani další ochranný mechanismus rostliny asociovaný se stavu dehydratace, tedy obsah dehydrinových proteinů (v tomto případě DHN5) není v případě odrůdy Er účinný (obrázek č. 21 a 23). Obsah DHN5 u této odrůdy byl na hranici denzitometrické detekovatelnosti. Jinak se chovala odrůda Jersey\_S. Ta vykazovala relativně nízký VSD v hodnotě 19,2 % a spadala do homogenní skupiny společně s Akcentem\_S, Malzem\_S a Amuletem\_S. Stejně tak naměřený osmotický potenciál byl jeden z nejvyšších (-2,23 MPa), což ukazuje na to, že tato odrůda měla nižší potřebu osmoticky se přizpůsobit podmínkám sucha, než odrůda Er\_S. Charakteristika  $\Delta^{13}\text{C}$  se u odrůdy Jersey\_S pohybovala v průměru 20,11 ‰, což ukazuje na to, že rostliny této varianty hospodařily s vodou průměrně, tedy velmi podobně jako Tolar\_S, Malz\_S, Tadmor\_S a Er\_S. Rostliny Jersey\_S syntetizovaly, resp. akumulovaly DHN5 na velmi nízké úrovni. Lze tedy vyslovit domněnku, že strategie rostlin odrůdy Jersey může primárně spočívat v efektivní regulaci transpirace na úrovni průduchů. Dalším významným faktorem může být i adaptační schopnost této odrůdy na úrovni kořenového systému, tedy v případě nedostatku vody může tato odrůda reagovat mohutným kořenovým systémem. Tato domněnka je v souladu s pozorovanou velikostí kořenového systému u rostlin odrůdy Jersey pěstované za sucha ve srovnání s jinými odrůdami (viz obrázek č. 20), nicméně nebyla nijak experimentálně ověřena.

*Obrázek č. 20: Srovnání kořenového systému rostlin odrůd Jersey (nalevo) a Akcent (napravo)*





Obrázek č. 21: Grafy znázorňující a) akumulaci DHN5, b) diskriminaci  $^{13}\text{C}$ , c) VSD, a) OP

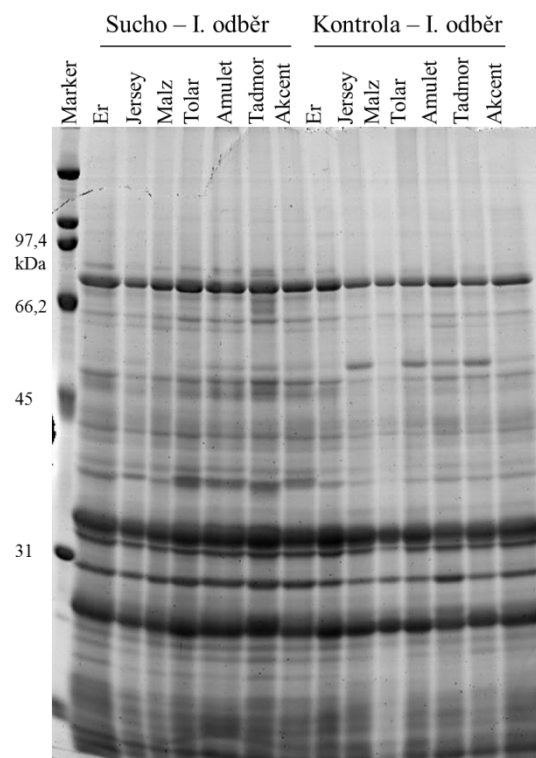


Odrůda Amulet, která byla testována i v předešlém experimentu, vykazovala v oblasti VSD u stresované varianty hodnotu 24,8 %, u kontrolní varianty pak 10,9 %. Hodnotu této charakteristiky u stresované varianty lze ve srovnání s ostatními odrůdami označit jako průměrnou. Osmotický potenciál dosáhl u Amuletu\_S v průměru hodnoty -2,28 MPa, kterou lze trendově označit jako jednu z nejvyšších, byť statisticky neprůkazně rozdílnou s Tolar\_S, Tadmor\_S, Akcent\_S a Jersey\_S. V těchto dvou charakteristikách tedy nevykazovala odrůda Amulet\_S žádné extrémní hodnoty. Nejinak tomu bylo i v případě diskriminace  $^{13}\text{C}$ , jejíž průměrná hodnota byla naměřena na úrovni 19,44 % a byla statisticky průkazně odlišná jen s  $\Delta^{13}\text{C}$  Er\_S. Nicméně hodnota  $\Delta^{13}\text{C}$  Amuletu\_S byla tendenčně nejnižší, je tedy možné říci, že tato odrůda za podmínek sucha hospodáří s vodou efektivněji než ostatní testované odrůdy, ovšem tento fakt nebyl statisticky průkazně prokázán.

Rostliny odrůdy Tolar pěstované za sucha vykazovaly relativně vysokou průměrnou hodnotu VSD 29,2 % (v homogenní skupině byl spolu s Malz\_S, Amulet\_S a Er\_S), přičemž

naměřený OP vykazoval průměrnou hodnotu -2,53 MPa (průměr se statisticky významně nelišil s Tadmor\_S, Akcent\_S, Amulet\_S a Jersey\_S). Syntéza osmoprotektik tedy zdaleka nedosahovala takové mohutnosti jako například u varianty Malz\_S (-2,88 MPa), jejíž VSD však byl 23,7 %. Průměrná diskriminace <sup>13</sup>C Tolaru\_S dosáhla hodnoty 19,83 ‰ a lze ji označit jako průměrnou (statisticky významně se lišila jen s Amuletem\_S a Akcentem\_S). V oblasti efektivity využití vody nevykazovala tato odrůda v porovnání s ostatními testovanými odrůdami vynikající výsledky. Avšak například při srovnání odrůd Jersey\_S a Tadmor\_S, které se statisticky signifikantně odlišovaly od Tolaru\_S v oblasti VSD, je patrné, že i za stavu vyššího vodního deficitu v těle rostlin Tolaru\_S, byla jejich schopnost efektivně využívat vodu na stejné úrovni, jako Jersey\_S a Tadmor\_S. Naprosto jiná reakce byla pozorována u Tolar\_S na úrovni akumulace dehydrinových proteinů, resp. DHN5. Rostliny Tolaru pěstované za sucha vykazovaly vysokou akumulaci DHN5. Obsah DHN5 byl u této odrůdy druhý nejvyšší ze všech testovaných odrůd. Zdá se tedy, že strategie, jakou se odrůda Tolar vyrovnává s nedostatkem vody, je silná exprese a následná akumulace dehydrinových proteinů. Naproti tomu nebylo zaznamenáno silnější snížení osmotického potenciálu cytoplasmy v důsledku akumulace nízko- i vysokomolekulárních osmoticky aktivních látek, a to ve vztahu k poměrně vysokému VSD.

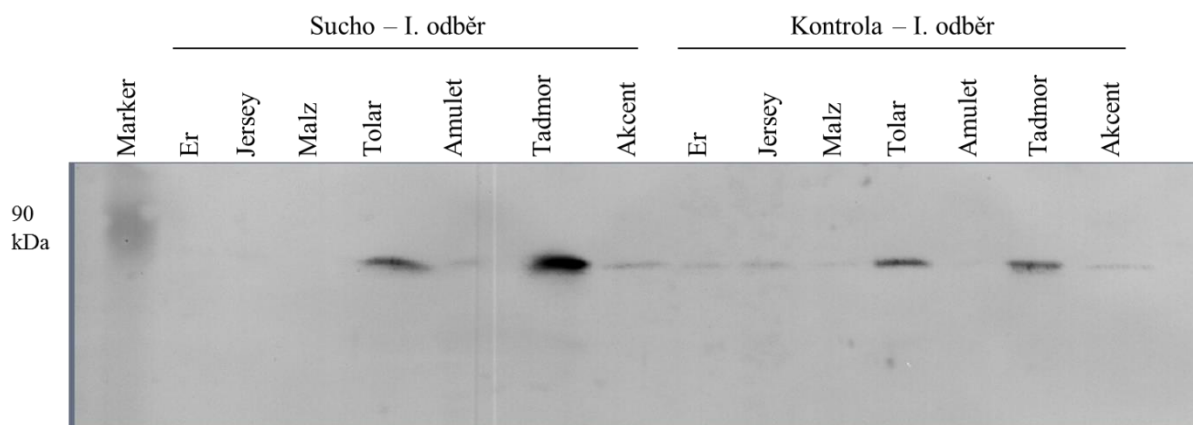
Obrázek č. 22: Elektroforetické rozdělení termostabilní frakce proteinů – I. odběr



Odrůda Tadmor\_S, která je velmi dobře adaptována na sucho, vykazovala OP (-2,4 MPa) jako odrůdy Tolar\_S, Akcent\_S, Amulet\_S a Jersey\_S, ovšem její VSD byl nejnižší (18 %) (spolu s Jersey – 19 %). Zajímavé zjištění je to, že VSD odrůdy Tadmor\_S a Er\_K bylo statisticky průkazně nerozdílné, tedy aktuální obsah vody v rostlině byl shodný u odrůdy, která byla pěstována za sucha a odrůdy, která byla pěstována za kontrolních podmínek. I když obsah vody v rostlinách odrůdy Tadmor poklesl ve srovnání s ostatními testovanými odrůdami suché varianty nejméně, OP byl nevýznamně rozdílný s pěti dalšími odrůdami. Tato skutečnost může být způsobena vysokou akumulací hydrofilních dehydrinových proteinů, které jsou součástí mechanismu osmotického přizpůsobení rostlin.

V oblasti efektivity využití vody dosahovala hodnota charakteristiky  $\Delta^{13}\text{C}$  odrůdy Tadmor\_S druhé nejvyšší hodnoty (20,4 ‰), byť tato hodnota byla statisticky nevýznamně rozdílná s hodnotami odrůd Er\_S, Jersey\_S, Malz\_S a Tolar\_S. Znamená to tedy, že v hospodaření s vodou ve vztahu k vytvořené sušině tato odrůda nevykazovala ve srovnání s ostatními odrůdami nejlepší výsledky. Klíčový mechanismus, jakým se tato syrská krajová odrůda vyrovnává s nedostatkem vody, se zdá být její velmi silná exprese dehydrinových genů, a to na úrovni akumulace konečného translačního produktu, tedy dehydrinových proteinů. Obsah DHN5 odrůdy Tadmor\_S v době I. odběru byl téměř 2,6 krát vyšší ve srovnání s Tolar\_S, nebo 25 krát vyšší než u odrůdy Amulet\_S a téměř 114 krát vyšší v porovnání s odrůdou Jersey\_S.

Obrázek č. 23: Imunoblot s vizualizovanými proužky DHN5 – I. odběr

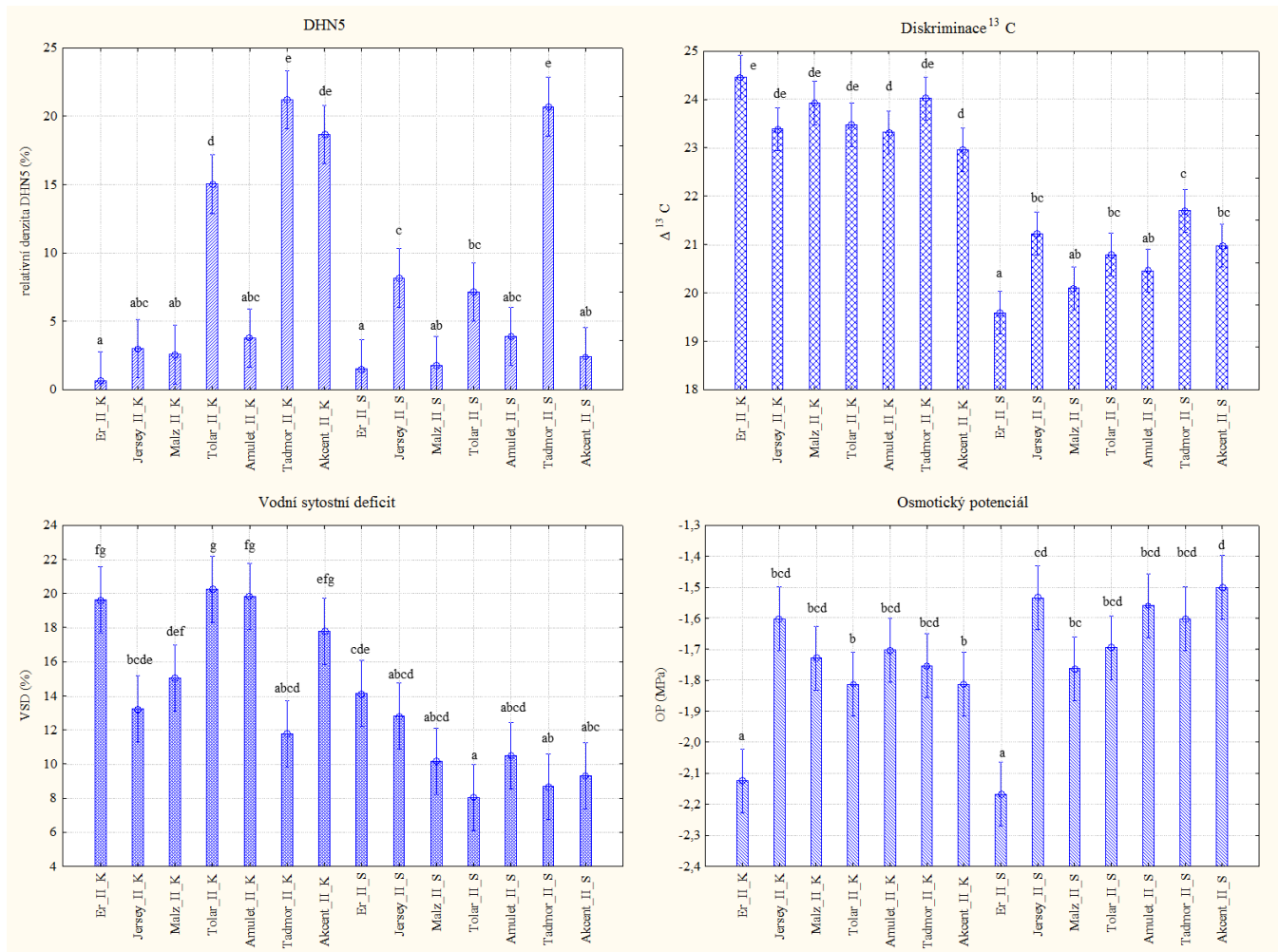


Jak již bylo uvedeno výše, pokus byl koncipován tak, že po prvním odběru vzorků byl obsah vody v půdě obou variant vyrovnán na 48 % PVK a za 7 dnů byl uskutečněn druhý odběr vzorků, přičemž půdní vlhkost při druhém odběru byla na hladině 32 % PVK.

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

Rostliny kontrolní varianty, které nebyly aklimatizovány na nízký obsah vody v půdě, se za těchto podmínek chovaly rozdílně. Je logické, že tyto neaklimatizované rostliny vykazovaly zvýšení VSD, které se pohybovalo od 11,8 % (Tadmor\_II\_K) do 20,2 % (Tolar\_II\_K). Při porovnání hodnot VSD 1. odběru suché varianty a 2. odběru kontrolní varianty je zřejmý velice zajímavý fakt stejného tendenčního rozložení odrůd z hlediska této vodní charakteristiky. Tímto zjištěním lze potvrdit to, že každá odrůda testovaných ječmenů udržuje obsah vody ve svém těle za totožných vlhkostních a teplotních podmínek na jiné úrovni.

Obrázek č. 24: Grafy znázorňující a) akumulaci DHN5, b) diskriminaci  $^{13}\text{C}$ , c) VSD, a) OP



V kontrolní, lépe řečeno neaklimatizované variantě, vykazovaly nejvyšší VSD odrůdy Er\_II\_K, Tolar\_II\_K a Amulet\_II\_K a Akcent\_II\_K. Naopak nejnižší VSD vykazovala odrůda Tadmor\_II\_K. Hodnota OP odrůdy Er\_II\_K byla nejnižší (-2,12 MPa), a to i přes to,

že obsah vody v tělech rostlin byl statisticky nevýznamně rozdílný se třemi výše uvedenými odrůdami (Tolar, Amulet a Akcent). Rostliny aklimatizované odrůdy Er\_II\_S vykazovaly průměrný VSD 14,1 % a statisticky významně se odlišovaly jen od aklimatizovaných rostlin Tolaru\_II\_S a Tadmoru\_II\_S. V charakteristice OP však za sebou tato odrůda zanechala všechny ostatní testované odrůdy. Například ve srovnání s aklimatizovanou variantou odrůdy Tolar\_II\_S, bylo VSD aklimatizované varianty odrůdy Er\_II\_S 1,76 krát vyšší, ovšem hodnota OP byla 1,27 krát nižší.

Rostliny odrůdy Er tedy reagují na sucho expresí enzymů, které působí v anabolických cestách, jejichž výsledkem je vysoký obsah nízkomolekulárních kompatibilních solutů. V případě odrůdy Er se pravděpodobně na snižování vodního, resp. osmotického potenciálu nepodílejí vysokomolekulární osmoticky aktivní látky typu hydrofilních dehydrinů. Toto zjištění bylo potvrzeno i denzitometrickou analýzou relativního obsahu DHN5. Z hlediska diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$ , neaklimatizovaná varianta rostlin odrůdy Er\_II\_K vykazovala nejvyšší  $\Delta^{13}\text{C}$  (statisticky nevýznamně rozdílně s Jersey\_II\_K, Malz\_II\_K, Tolar\_II\_K a Tadmor\_II\_K). To znamená, že neaklimatizované rostliny nedokázaly zmobilizovat mechanismy, které by jim zajistily efektivněji hospodařit s vodou v podmínkách náhlého vysychání. Naproti tomu aklimatizované rostliny této odrůdy vykazovaly nejnižší průměrný  $\Delta^{13}\text{C}$ , statisticky nevýznamně rozdílně s Malz\_II\_S a Amulet\_II\_S, což znamená, že v podmínkách náhlého vysychání mají rostliny této odrůdy mechanismy, které jim zaručují efektivněji využívat vodu ve srovnání s jinými testovanými odrůdami, ovšem pouze za předpokladu, že již byly aklimatizovány na podmínky sucha.

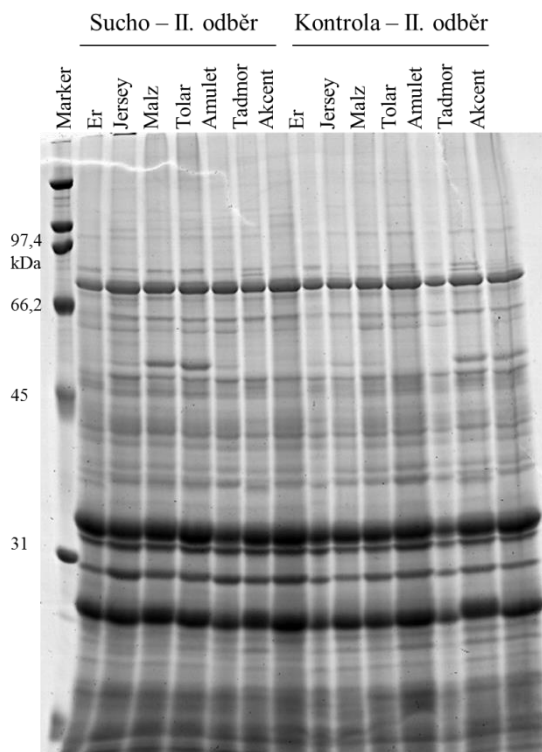
Neaklimatizované rostliny odrůdy Tolar\_II\_K vykazovaly po vysychání tendenčně nejvyšší VSD, zatímco u aklimatizované varianty tato odrůda vykazovala tendenčně nejnižší VSD (statisticky významně rozdílně s Er\_II\_S). Zajímavé je zjištění, že ač VSD (20,2 %) neaklimatizované odrůdy Tolar\_II\_K bylo 2,52 krát vyšší, než VSD (8,0 %) aklimatizovaných rostlin stejné odrůdy, OP obou variant byl statisticky významně nerozdílný. To tedy značí, že tato odrůda primárně staví svoji strategii vyrovnávání se se stavy dehydratace na mechanismech silného osmotického přizpůsobení, a to hlavně syntézou vysokomolekulárních hydrofilních dehydrinových proteinů. Toto je v souladu s výsledky relativní akumulace DHN5, neboť obsah tohoto dehydrinového proteinu byl v aklimatizovaných rostlinách Tolaru\_II\_K vysoký. Z hlediska efektivity využití vody, resp. charakteristiky  $\Delta^{13}\text{C}$  se neaklimatizované rostliny této odrůdy statisticky významně nelišily od ostatních odrůd. Rostliny Tolaru při vysychání, tedy při náhlé ztrátě vody, využívají dostupnou vodu víceméně stejně efektivně, jako ostatní testované odrůdy. Je ovšem zajímavé,

že odrůdy Jersey\_II\_K a Malz\_II\_K vykazovaly statisticky významně nižší VSD než právě Tolar\_II\_K (analogicky také OP), nicméně v hodnotách diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  se statisticky významně nelišily. Aklimatizované rostliny Tolaru vykazovaly v oblasti diskriminace  $^{13}\text{C}$  průměrné hodnoty, tedy ani aklimatizované rostliny nevyužívaly vodu výrazněji efektivněji než ostatní testované (vyjma odrůdy Er).

Odrůda Tadmor se v oblasti vodního režimu chovala odlišně. Při porovnání hodnot VSD aklimatizované (8,7 %) a neaklimatizované varianty (11,8 %) odrůdy Tadmor je patrné, že se statisticky významně neliší. Navíc průměrné VSD neaklimatizovaných rostlin této odrůdy je tendenčně nejvyšší. Lze tedy prohlásit, že v podmínkách náhlého vysychání má tato odrůda, byť nebyla předtím aklimatizována na sucho, mechanismy zamezující náhlé ztrátě vody z těla rostliny. Velmi podobně reagovaly i odrůdy Jersey\_II\_K (13,2 %) a Malz\_II\_K (15,1 %). Z hlediska OP se neaklimatizované rostliny varianty Tadmoru\_II\_K statisticky významně nelišily od ostatních odrůd, vyjma odrůdy Er\_II\_K (-2,12 MPa). Hodnoty OP, jako v případě VSD, se statisticky významně nelišily u aklimatizovaných (-1,60 MPa) a neaklimatizovaných rostlin (-1,75 MPa) Tadmoru. Neaklimatizované a aklimatizované rostliny Jersey (-1,60 MPa; -1,53 MPa) a Malz (-1,73 MP; -1,76 MPa) se také v charakteristice OP statisticky významně nelišily, i když z průměrných hodnot lze usoudit, že tendenční hodnota OP odrůdy Malz je nižší, což značí vyšší obsah osmoprotektik v buňkách. Co se týče hodnot  $\Delta^{13}\text{C}$ , vykazovaly neaklimatizované rostliny Tadmoru\_II\_K (24,02 ‰), Jersey\_II\_K (23,39 ‰) a Malzu\_II\_K (23,93 ‰) statisticky shodné výsledky, v rámci této varianty tedy tyto odrůdy využívaly vodu podobně efektivně, přičemž tendenčně nejméně diskriminovala izotop  $^{13}\text{C}$  odrůda Jersey\_II\_S. Jinak reagovaly aklimatizované rostliny. Odrůda Tadmor\_II\_S diskriminovala  $^{13}\text{C}$  nejvíce (21,7 ‰) a statisticky významně rozdílně oproti Malz\_II\_S (20,1 ‰). V oblasti účinnosti využití vody tedy odrůda Tadmor není příliš efektivní, alespoň ve srovnání s ostatními testovanými odrůdami. Naproti tomu aklimatizované odrůdy Jersey\_II\_S (statisticky neprůkazně) a Malz\_II\_S využívají vodu efektivněji. V oblasti akumulace dehydrinových proteinů, resp. DHN5 se tyto tři odrůdy chovaly odlišně. Zatímco u neaklimatizovaných rostlin Tadmoru\_II\_K po vysychání substrátu mohutně vzrostla syntéza DHN5, u Jersey\_II\_K a Malz\_II\_K byla také zaznamenána zvýšená akumulace DHN5, nicméně zdaleka ne v takové míře, jako u Tadmoru. Obsah DHN5 Tadmoru\_II\_K byl ve srovnání s Jersey\_II\_K 7 krát vyšší, ve srovnání s Malz\_II\_K 8,3 krát vyšší. Akumulace DHN5 u aklimatizovaných rostlin byla odlišná. Zatímco u odrůdy Malz\_II\_S nebyl denzitometrickou analýzou zaznamenán nárůst obsahu DHN5 oproti aklimatizovaným rostlinám, obsah DHN5 u aklimatizované odrůdy Jersey\_II\_S vzrostla 2,7

krát. Obsah DHN5 u aklimatizovaného Tadmoru\_II\_S byl téměř shodný s obsahem DHN5 u Tadmoru\_II\_K a ve srovnání s Jersey\_II\_S byl 2,5 krát vyšší, ve srovnání s Malzem\_II\_S pak 11,7 krát vyšší.

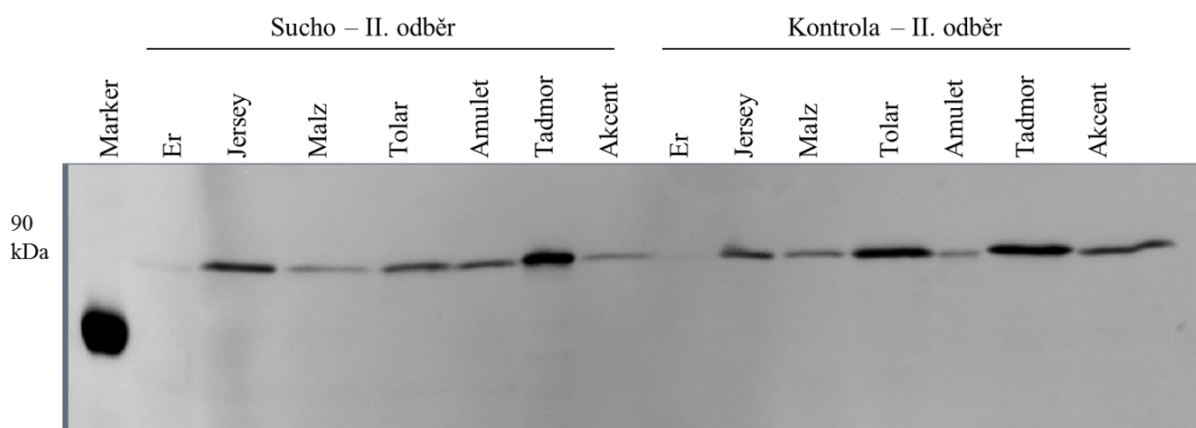
Obrázek č. 25: Elektroforetické rozdělení termostabilní frakce proteinů – II. odběr



Při porovnání odrůd Amulet a Akcent v druhé fázi pokusu, tedy vysychání, je zřejmé, že v charakteristice VSD nevykazovaly tyto dvě odrůdy statisticky významné rozdíly, a to jak aklimatizované rostliny (Amulet – 10,5 %; Akcent – 9,3 %), tak ani rostliny neaklimatizované (Amulet – 19,8 %; Akcent – 17,8 %). Zdá se tedy, že tyto dvě odrůdy mají velmi podobnou schopnost regulace výdeje vody, byť je patrné, že odrůda Akcent vykazuje tendenčně nižší VSD. V oblasti OP byly výsledky podobné a opět statisticky neprůkazně rozdílné. U neaklimatizovaných rostlin nárůstem obsahu osmolytů klesl OP, a to u Amuletu\_II\_K na -1,70 MPa, u Akcentu\_II\_K pak na -1,81 MPa. U aklimatizovaných rostlin naopak OP stoupl (Amulet\_II\_S – -1,56 MPa; Akcent\_II\_S – -1,50 MPa). To je naprosto pochopitelné, neboť u aklimatizovaných rostlin došlo ke snížení VSD, naopak u neaklimatizovaných rostlin VSD vzrostl. I v parametru diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  vykazovaly obě odrůdy statisticky nevýznamně rozdílné výsledky. I když u neaklimatizovaných odrůd tendenčně méně diskriminovala  $^{13}\text{C}$  odrůda Akcent\_II\_K, mezi aklimatizovanými odrůdami si vedl lépe Amulet\_II\_S. Obecně lze říci, že v parametrech VSD, OP a  $\Delta^{13}\text{C}$  se odrůdy Amulet a Akcent

chovaly velmi podobně. Zásadní rozdíl v reakci těchto odrůd se zdá být v akumulaci dehydrinového proteinu DHN5. Zatímco v první fázi pokusu se odrůdy Akcent a Amulet ani v suchu ani v kontrole neodlišovaly (tendenčně vykazoval vyšší obsah DHN5 Akcent). V druhé fázi pokusu byl však u neaklimatizovaných rostlin Akcentu\_II\_K pozorován mohutný nárůst v obsahu DHN5, a to dokonce statisticky neprůkazně rozdílně s Tadmorem\_II\_K. Obsah DHN5 u Akcentu\_II\_K byl ve srovnání s Amuletem\_II\_K skoro 5 krát vyšší. Naopak u aklimatizovaných rostlin nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Z tohoto lze usuzovat, že odrůda Akcent reaguje v podmínkách náhlého vysychání silnou proteosyntézou a akumulací dehydrinových proteinů, zatímco odrůda Amulet syntetizovala dehydriny, resp. DHN5 průměrně.

Obrázek č. 26: Imunoblot s proužky vizualizovaného DHN5 – II. odběr



### 5.3.1 Faktorová analýza – I. odběr

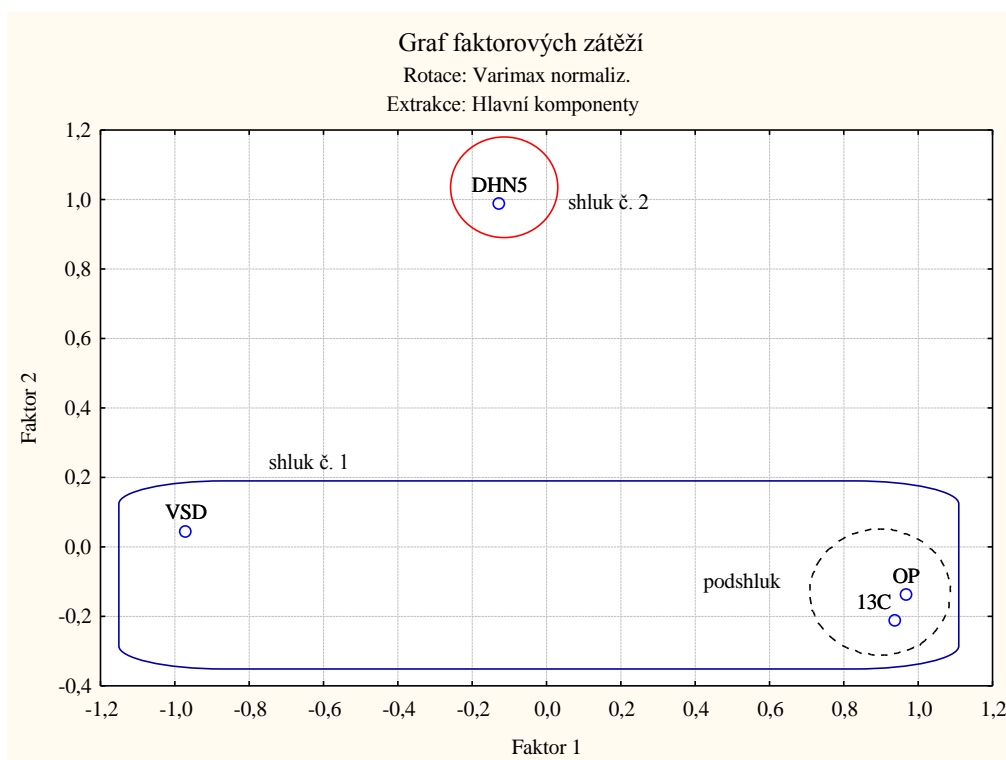
Další statistické šetření probíhalo formou faktorové analýzy. Vypočtené hodnoty vlastních čísel ukázaly, že první vlastní číslo (2,9) vysvětluje 72,7 % z celkového rozptylu, druhé vlastní číslo (0,91) vysvětluje 22,8 % z celkového rozptylu, kumulativně potom vysvětlují první dvě vlastní čísla 95,5 % z celkového rozptylu. Byť je 2. vlastní číslo menší než 1, byl považován 2 faktor za nejslabší faktor, který byl ještě zařazen do modelu faktorové analýzy.

Po provedené rotaci faktorů byly vypočteny faktorové zátěže. 1. faktor koreloval s charakteristikami  $\Delta^{13}\text{C}$ , VSD a OP. Proměnné  $\Delta^{13}\text{C}$  a OP jsou navzájem v přímé úměře, VSD k nim stojí v úměře nepřímé. S faktorem č. 2 významně koreluje akumulace DHN5. Při promítnutí faktorových zátěží jednotlivých proměnných do faktorové roviny je viditelné, že všechny proměnné mají vysokou faktorovou zátěž buď k jednomu, nebo ke druhému faktoru, přičemž  $\Delta^{13}\text{C}$ , VSD a OP tvoří shluk č. 1 a DHN5 je v grafu označen jako shluk č. 2



(obrázek č. 27). Z grafu na obrázku č. 27 je zřejmé, že OP a  $\Delta^{13}\text{C}$  stojí velmi blízko u sebe, z toho je patrný velmi podobný průběh těchto dvou charakteristik. To je velice zajímavé zjištění, neboť kontrolní varianty, které vykazují oproti variantám stresovaným vyšší OP, vykazují také vyšší diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$  a naopak, stresované varianty vykazují nižší OP (vyšší VSD) a nižší diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$ . Naopak charakteristiky OP a VSD stojí v protilehlých kvadrantech, což značí fakt, že jsou navzájem nepřímo úměrné. To je logické, neboť ztráta vody z buněk je spouštěcím mechanismem pro syntézu osmoticky aktivních látek. Naproti tomu charakteristiku DHN5 lze označit jako unikátní, neboť nekoreluje s žádnou měřenou fyziologickou charakteristikou a jako jediná významně ovlivňuje faktor č. 2.

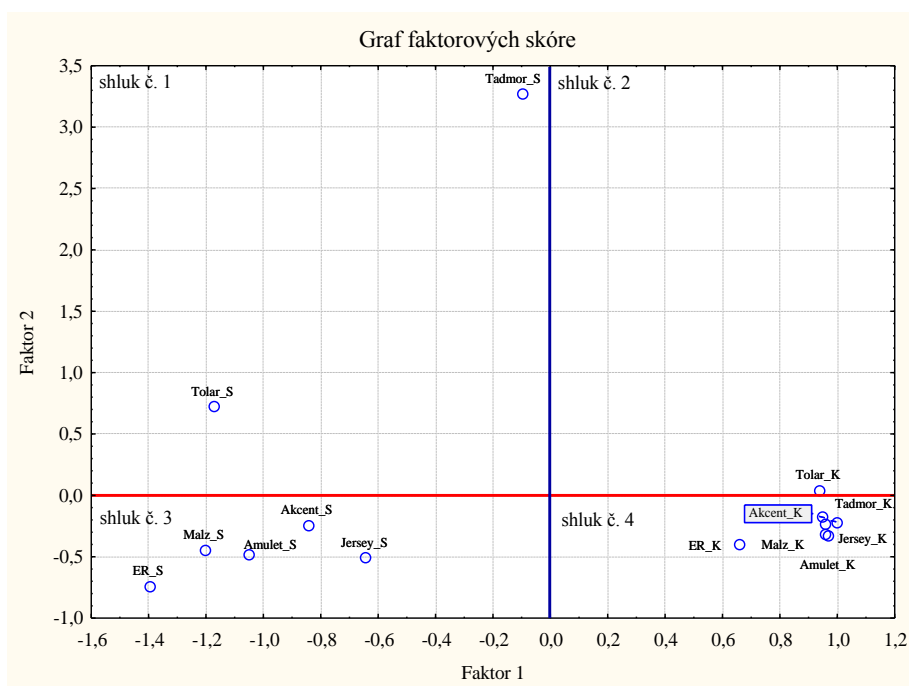
Obrázek č. 27: Graf faktorových zátěží



Převod jednotlivých pozorování do faktorového prostoru znázorňuje graf na obrázku č. 28. Je to vlastně výpočet hodnot faktoru č. 1 a faktoru č. 2 pro jednotlivé odrůdy a varianty. Z tohoto grafu je patrné, že odrůdy kontrolní varianty se chovaly velmi podobně. Nepatrně se odlišovaly jen odrůdy Tolar a Er, přičemž odrůda Tolar vykazovala vyšší hodnoty faktoru č. 2 a odrůda Er nižší hodnoty faktoru č. 1. Zajímavější je rozprostření odrůd ječmene ve faktorovém prostoru u suché varianty. Je viditelný diametrální rozdíl v reakci rostlin odrůdy

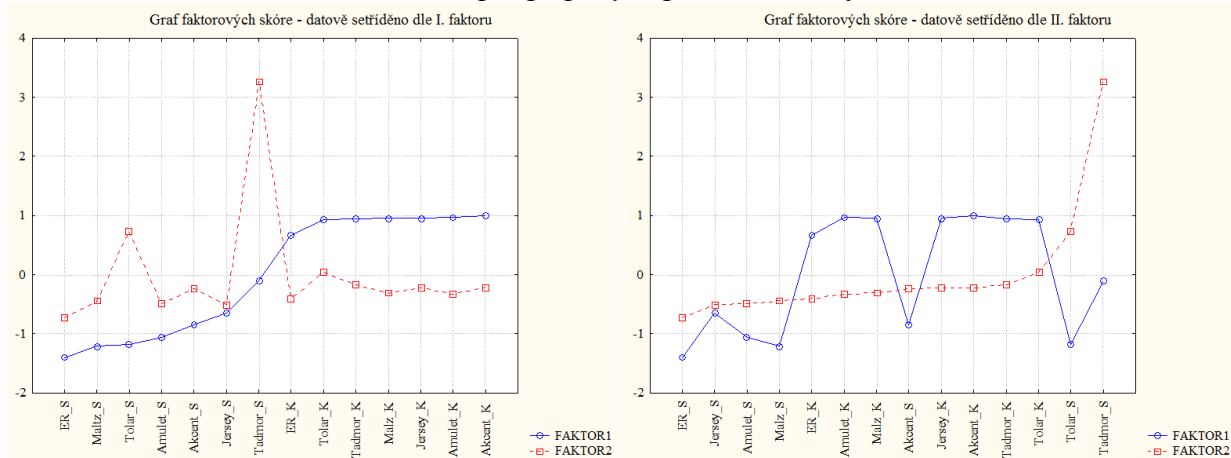
Tadmor vzhledem k ostatním testovaným odrůdám, a to jak v posunu po ose X (faktor č. 1), tak i po ose Y (faktor č. 2). Zajímavé je, že odrůda Tadmor pěstovaná za sucha byla v hodnotách faktoru č. 1 „napůl cesty“ mezi shlukem odrůd kontrolní varianty a mezi odrůdami stresovanými. Co se týče hodnoty faktoru č. 2, je zdaleka nejvyšší ze všech testovaných odrůd. Další vyčnívající odrůdou je Tolar, který vykazuje vysokou hodnotu faktoru č. 2, který je spojený s obsahem DHN5, nicméně hodnoty faktoru č. 1 u této odrůdy byly průměrné. U dalších testovaných odrůd nebyly zaznamenány významné difference v oblasti hodnot faktoru č. 2, tedy obsah DHN5 byl víceméně podobný. Jinak tomu bylo v případě hodnot faktoru č. 1. Odrůdy byly rozloženy podél osy X s tím, že při zobecnění lze prohlásit, že odrůda mající nejnižší hodnotu faktoru č. 1, by měla vykazovat nejmenší diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$ , nejvyšší VSD a naopak nejnižší OP.

Graf č. 28: Graf faktorových skóre



Graf na obrázku č. 29 znázorňuje datově setříděný soubor dat podle hodnot faktoru č. 1, tedy podle hodnot charakteristik  $\Delta^{13}\text{C}$ , VSD a OP. Je patrné, že nejnižší hodnotu 1. faktoru vykazuje suchá varianta odrůdy Er, přičemž z křivky průběhu hodnot faktoru 2 je viditelné, že tato odrůda vykazovala i nejnižší hodnoty akumulace DHN5. Jako zajímavý se může jevit například Tolar, který vykazoval zvýšenou hodnotu faktoru č. 2 a průměrnou hodnotu faktoru č. 1.

Obrázek č. 29: Datově seříděné vstupní případy experimentu dle faktoru č. 1 a 2



Tato disertační práce je zaměřena na proteinové markery. Na základě vědeckých prací (Kosová *et al.*, 2007) lze o dehydrinových proteinech prohlásit, že jsou právě takovými proteinovými markery, neboť se akumulují uvnitř rostlinných buněk v odezvě na různé abiotické stresové faktory spojené s buněčnou dehydratací. Z tohoto důvodu je datové seřídění jednotlivých pozorování dle faktoru č. 2 pro účely této disertační práce relevantnější.

### 5.3.2 Faktorová analýza – II. odběr

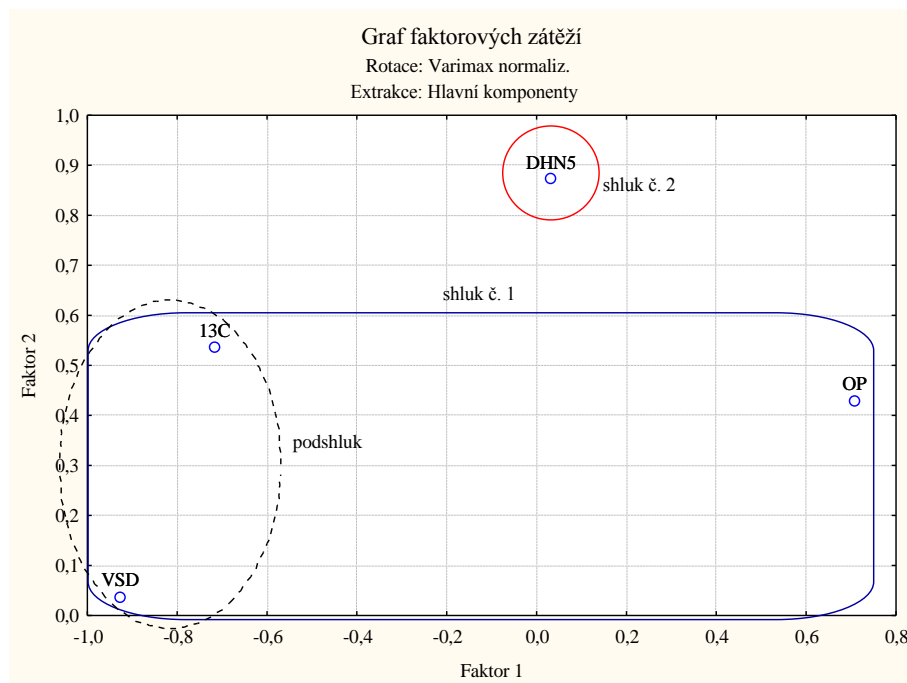
Faktorová analýza byla aplikována rovněž na data druhého odběru, který následoval 7 dní po vyrovnání obsahu půdní vody. Hodnoty prvních dvou vlastních čísel (kumulativně 3,12) vysvětlují 78 % z celkového rozptylu. Pro další výpočty byla použita první dvě vlastní čísla.

Z vypočtených faktorových zátěží je zřejmá korelační struktura faktorů a proměnných (obrázek č. 30). První faktor koreluje s proměnnými  $\Delta^{13}\text{C}$ , VSD a OP. Druhý faktor potom významně koreluje s akumulací DHN5, z tohoto pohledu lze opět tuto charakteristiku označit jako unikátní. Korelační struktura ovšem není stejná, jako v předešlé fázi pokusu. Diference je především v tom, že přímou úměrnost vykazují charakteristiky  $\Delta^{13}\text{C}$  a VSD, přičemž OP je nepřímo úměrný k těmto dvěma charakteristikám. Další zajímavou změnou je to, že k faktoru č. 2 má středně vysokou zátěž také charakteristika  $\Delta^{13}\text{C}$  a OP, což znamená, že ve faktoru č. 2 jsou obsaženy i tyto proměnné.

Při projekci faktorových zátěží do faktorového prostoru (obrázek č. 30) lze vyzorovat, že distribuce jednotlivých charakteristik v prostoru je odlišná od rozmístění proměnných v první části pokusu (obrázek č. 27). Velice zajímavý je fakt přesunu znaku  $\Delta$

$^{13}\text{C}$  do záporných hodnot faktoru č. 1, čímž se stal přímo úměrným ke znaku VSD. Všechny znaky mají vysokou faktorovou zátěž, proto je lze označit jako čisté původní znaky.

Obrázek č. 30: Graf faktorových zátěží

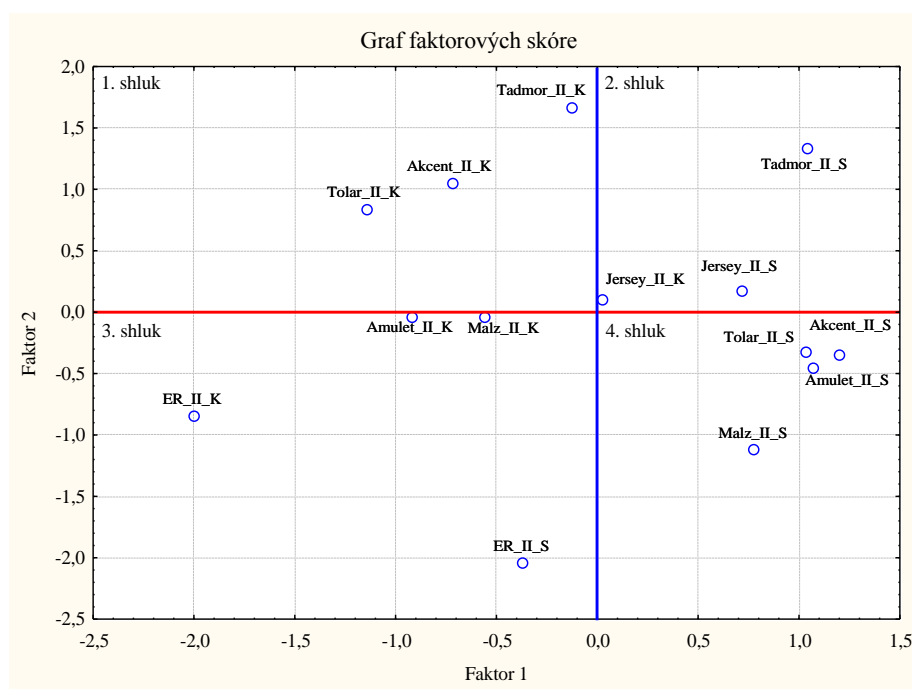


Velmi zajímavé je rozložení jednotlivých pozorování do faktorové roviny, které je odlišné od rozložení v prvním odběru a je znázorněno na obrázku č. 31. Zatímco odrůdy kontrolní varianty prvního odběru byly ve faktorovém prostoru soustředěny víceméně do jedné oblasti, odrůdy stejné varianty odebrané ve druhém odběru se rozprostřely ve faktorovém prostoru. Z aklimatizovaných odrůd vykazovala nejnížší hodnoty faktoru č. 1 a faktoru č. 2 odrůda Er\_II\_S, což značí, že tato odrůda vykazovala nejnížší akumulaci DHN5 a při zobecnění, nejvyšší hodnoty VSD a  $\Delta^{13}\text{C}$  a nejnížší OP. Naproti tomu odrůdy aklimatizované varianty Amulet\_II\_S, Malz\_II\_S a Jersey\_II\_S mají velice podobné hodnoty faktoru č. 2, což znamená, že v oblasti akumulace dehydrinových proteinů, resp. DHN5 se chovaly velmi podobně. Rozdílně se tyto odrůdy chovaly v oblasti zbylých měřených fyziologických charakteristik. Zbylé odrůdy již byly rozprostřeny ve faktorovém prostoru jak podle faktoru č. 1, tak podle faktoru č. 2.

Při porovnání chování aklimatizovaných a neaklimatizovaných odrůd druhého odběru je zřejmé, že princip náhlého vysychání dokáže odrůdy lépe odlišit, což lze označit za velmi dobrý výsledek. Zatímco obsah DHN5 prvního odběru u kontrolních i stresovaných odrůd byl kromě Tolaru\_S a Tadmoru\_S statisticky neprůkazně odlišný, rostliny ve fázi vysychání

akumulovaly DHN5 rozdílně. Z toho lze vyvodit, že rostliny testovaných odrůd ječmenů v této fenologické fázi, tedy mezi 1. a 2. pravým listem, reagují na permanentní sucho jinými obrannými mechanismy než syntézou DHN5, a to například snížením OP, které tkví dle výsledků denzitometrické analýzy relativní abundance DHN5 hlavně v mohutné syntéze nízkomolekulárních osmoprotektik. Za sucha také jednotlivé odrůdy jinak regulují ztrátu vody z těla a odlišně diskriminují izotop  $^{13}\text{C}$ . Naopak při náhlém vysychání rostliny zapojují mechanismy silné proteosyntézy a následně akumulace dehydrinových proteinů, resp. DHN5, neboť rostliny v této fenologické fázi zřejmě nesyntetizují nízkomolekulární dehydriny nebo je jejich syntéza pod hranicí denzitometrické detekovatelnosti. Kromě této důležité vlastnosti zapojují rostliny také mechanismy hospodaření s vodou a osmotického přizpůsobení.

Obrázek č. 31: Graf faktorových skóre

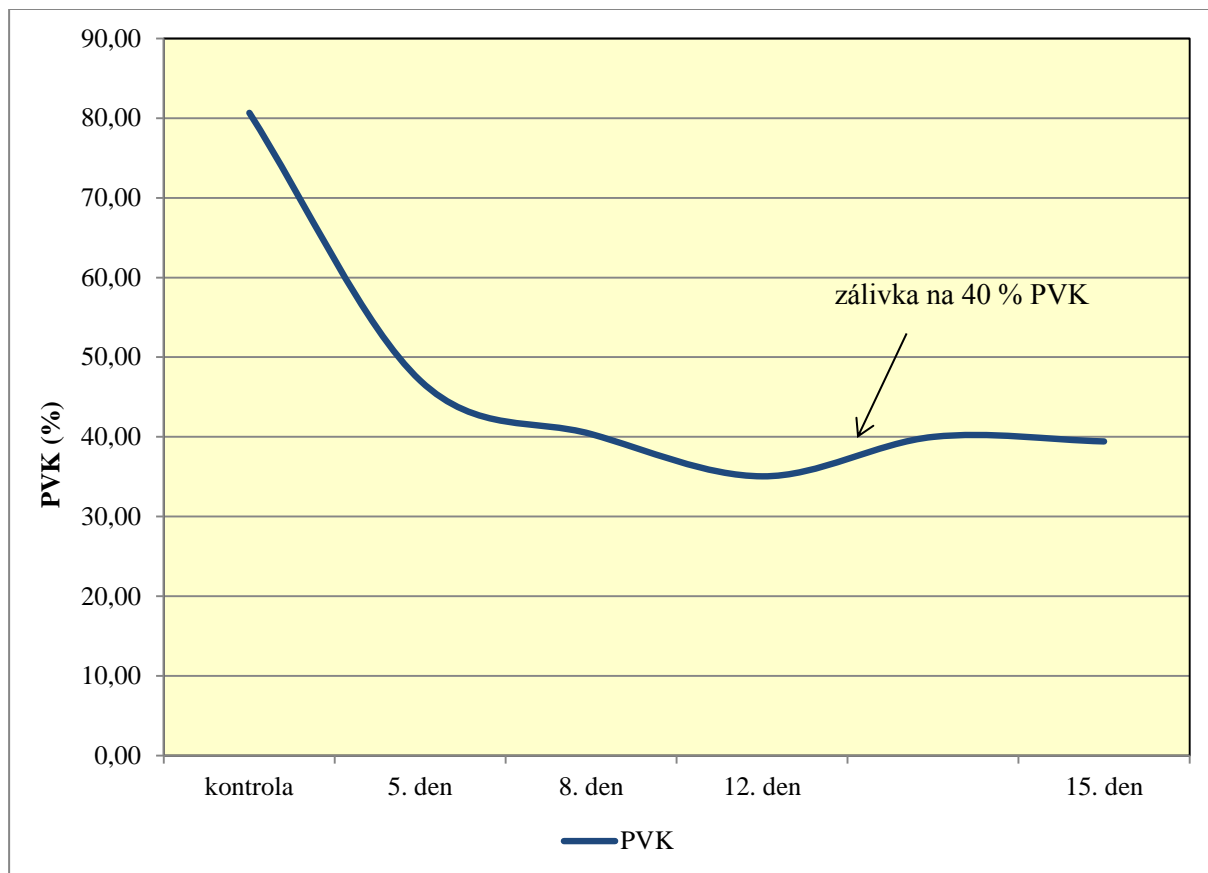


### 5.4 Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání

Myšlenkou tohoto experimentu bylo zachytit a analyzovat chování rostlin, které byly vystaveny postupnému suchu a dále tzv. fázi obnovy (recovery phase). Kosová *et al.* (2011b) charakterizuje fázi „recovery“ jako aktivaci procesů vedoucích k degradaci protektivních komponent syntetizovaných během fáze aklimatizace, což vede k ustavení nové buněčné rovnováhy poté, co pomine působení stresu. Graf na obrázku č. 32 ukazuje postupné ubývání půdní vlhkosti z výchozích 80 % PVK, přičemž po 12. dnech vysychání byla

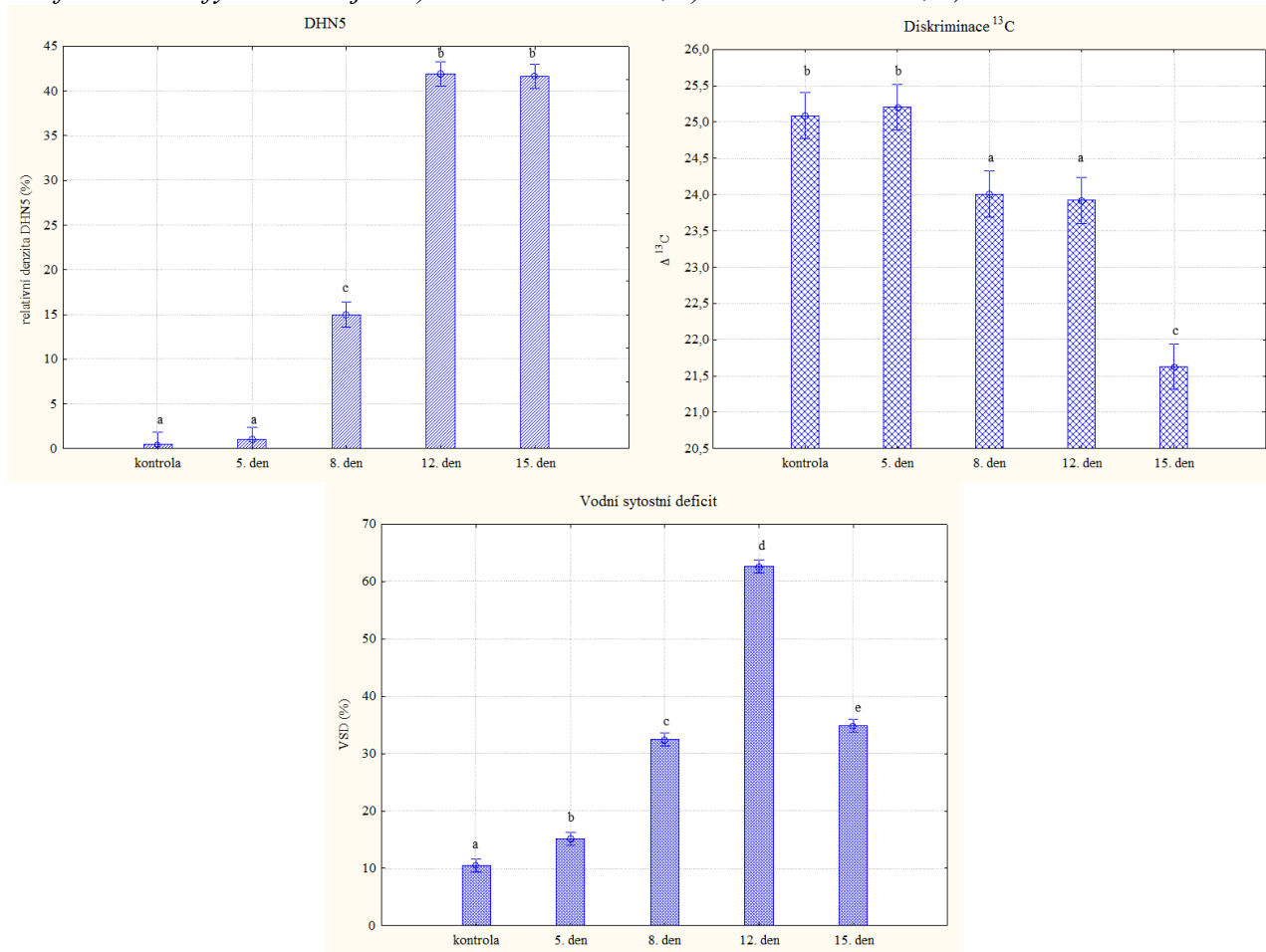
zálivkou půdní vlhkost vyrovnána na 40 % PVK a byla udržována na této hladině až do dne odběru, který se uskutečnil 15. den.

*Graf č. 32: Graf průběhu půdní vlhkosti při vysychání substrátu*



Výsledky vodního sytostního deficitu znázorněné na obrázku č. 33 ukazují, že mezi všemi variantami byl naměřen statisticky významný rozdíl. Po 5. dnech poklesl obsah vody v půdě z původních 80 % na 47 % PVK. I přes to nárůst vodního sytostního deficitu nebyl nijak razantní. Lze to vysvětlit tím, že rostliny za těchto vlhkostních podmínek ještě dokázaly regulovat výdej vody. Zásadní změna nastala až osmý den po poslední zálivce, kdy obsah vody v půdě klesl na 40 % PVK, čemuž odpovídalo 32 % VSD. Všechny rostliny v této fázi vykazovaly zjevné známky počátečního nedostatku vody (zavadání). Rostliny začaly silně syntetizovat dehydrinový protein DHN5, jak je znázorněno v grafu na obrázku č. 33. Z tohoto lze vyvodit, že výraznější exprese DHN5 je odstartována, pokud obsah vody v rostlině poklesne pod 30 %. V tento moment byl zaznamenán i statisticky významný pokles v charakteristice  $\Delta^{13}\text{C}$ , tedy rostliny za tohoto vodního režimu začaly významně méně diskriminovat izotop  $^{13}\text{C}$  a začaly tedy efektivněji využívat vodu.

Graf č. 33: Grafy znázorňující a) akumulaci DHN5, b) diskriminaci  $^{13}\text{C}$ , c) VSD



Po 12. dnech poklesl obsah vody v půdě pěstovaných rostlin na 35 % PVK, což je nejnižší pokles mezi po sobě následujícími variantami. I přes tento fakt VSD vzrostlo na téměř 63 %, tedy dvakrát oproti předešlému odběru. Tento velmi nízký obsah vody v rostlině již fyziologové považují za letální. Při takto vysoké ztrátě vody rostliny již nejsou schopny významně regulovat další její úbytek mechanismem stomatální regulace. Vizuálně rostliny byly silně zavadlé a vykazovaly výrazné symptomy nedostatku vody. Velice zajímavé je, že ač došlo k prudkému poklesu obsahu vody v rostlinách, již nedošlo k dalšímu snížení diskriminace  $^{13}\text{C}$ , rostliny tedy v tomto extra suchu nezačaly využívat vodu účinněji, neboť s největší pravděpodobností již dosáhly v tomto ohledu za stávajících podmínek svého geneticky determinovaného stropu. Naopak, co se týče zvýšení obsahu DHN5, došlo k téměř 2,6 krát nárůstu obsahu DHN5 za čtyři dny. Toto je v souladu s informacemi o významné roli dehydrinů v aklimatizačních procesech rostlin a jejich přispívání k toleranci rostlin při působení stresorů asociovaných s dehydratačními procesy. Dehydriny mají zřejmě funkci

jako stabilizátory buněčných struktur (Škodáček *et al.*, 2010a) a inhibitory koagulace makromolekul, čímž napomáhají udržovat integritu buněk (Close, 1997).

Po odběru vzorků 12. den pěstování rostlin v postupně vysychajícím substrátu, jehož vlhkost klesla na 35 % PVK, byl pěstební substrát saturován na 40 % PVK. Na této hladině byla vlhkost udržována po tři dny a na jejichž konci byly odebrány vzorky. Při odběru (15. den) rostliny vykazovaly jen slabý až velmi slabý nedostatek vody, jejich pletiva nebyla sice plně turgescenční, ale ani zavadlá. VSD bylo na úrovni necelých 36 %, tedy velmi podobné jako VSD, který vykazovaly rostliny 8. den pokusu (VSD 32 %), byť obě tyto varianty byly statisticky vyhodnoceny jako signifikantně odlišné. I přes to, že obsah vody v rostlinách se rapidně zvýšil a rostliny již nevykazovaly ani symptomaticky závažný nedostatek vody, obsah DHN5 nikterak nepoklesl. Z tohoto lze usuzovat na to, že degradace dehydrinových proteinů není zahájena ihned po stabilizaci vodního režimu rostliny, a dokonce ani po několika dnech. Tímto se potvrzují informace z vědeckých prací (Kosová *et al.*, 2007, Suprunova *et al.*, 2004), které hovoří o faktu, že dehydrinové proteiny mají důležitou funkci v aklimatizačních procesech rostlin. Tyto aklimatizační procesy, které můžeme označit jako komplexní, jsou záležitostmi, které trvají vždy po určitou dobu a nejsou otázkou krátkodobého charakteru v řádu hodin, a proto zřejmě nedošlo ke snížení obsahu DHN5.

Zcela odlišně se rostliny chovaly v oblasti diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$ . Charakteristika  $\Delta^{13}\text{C}$ , která nepřímo úměrně vypovídá o účinnosti využití vody, klesla až na úroveň 21,5 ‰, tedy nejnižší ze všech odběrů. Tato hodnota odpovídá hodnotám  $\Delta^{13}\text{C}$  u rostlin, které rostly a vyvíjely se za podmínek, které lze definovat jako sucho, resp. nedostatek vody. Tento jev snižující se diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  (a naopak zvyšující se efektivitu využití vody) i za podmínek, kdy došlo ke zvratu ve vodním režimu rostliny, zřejmě souvisí s aklimatizační reakcí rostliny, která byla odstartována při postupném snižování obsahu vody v půdě (s tím je samozřejmě spojený úbytek obsahu vody v rostlině), a která trvala 15 dnů. Je možné se domnívat, že aklimatizační proces není ihned zvrátitelný, rostlina pokračuje v tomto procesu po nějakou dobu i za vlhkostních podmínek, které lze označit jako relativně vhodné. Tomuto faktu nasvědčuje i relativní akumulace DHN5 (viz výše).

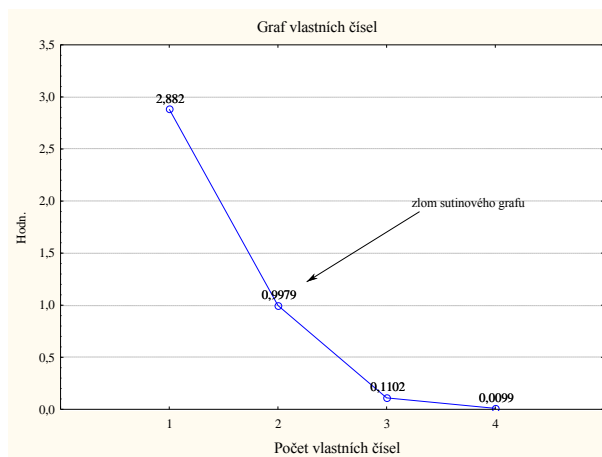
### **5.4.1 Faktorová analýza**

Jako v předchozích případech byla i v tomto experimentu využita faktorová analýza. První dva faktory hodnot vlastních čísel faktorové analýzy vysvětlují z celkového rozptylu 99,5 %. I když je vlastní číslo 2. faktoru menší než 1 (0,55), byl považován za nejslabší



faktor, který byl ještě zařazen do modelu faktorové analýzy. Toto je v souladu se sutinovým grafem (obrázek č. 34), jehož zlom lze pozorovat na úrovni 2. vlastního čísla.

Obrázek č. 34: Graf vlastních čísel



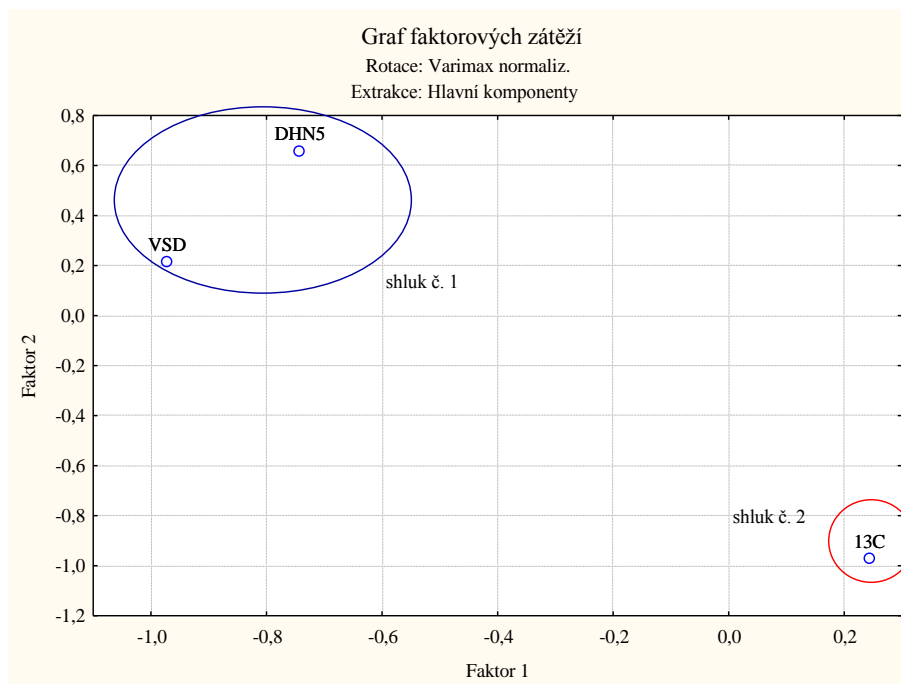
Po provedené rotaci faktorů, která zajistí, aby každá vstupní proměnná byla výrazně korelována jen s jedním faktorem, byly vypočteny faktorové zátěže. Z tabulky č. 15 je zřejmé, že 1. faktor významně koreluje s VSD a DHN5. Tyto proměnné jsou si navzájem přímo úměrné. Podle věcného významu dvou charakteristik korelujících s faktorem č. 1, jej lze interpretovat jako stav vodního poměru rostlin krátkodobějšího charakteru. S faktorem č. 2 významně koreluje  $\Delta^{13}\text{C}$ . Tento faktor lze tedy zobecnit jako stav vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru.

Tabulka č. 15: Faktorové zátěže (korelace vstupních proměnných a faktorů)

Faktor. zátěže (Varimax normaliz. ) Extrakce: Hlavní komponenty		
Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
VSD	-0,97428	0,218073
$^{13}\text{C}$	0,241502	-0,96917
DHN5	-0,74403	0,66201

Při promítnutí faktorových zátěží jednotlivých proměnných do faktorové roviny (obrázek č. 35) lze vypožorovat, že všechny původní znaky mají vysokou faktorovou zátěž k jednomu nebo druhému faktoru. Dle tohoto pak DHN5 a VSD tvoří shluk proměnných č. 1 a  $\Delta^{13}\text{C}$  tvoří shluk č. 2.

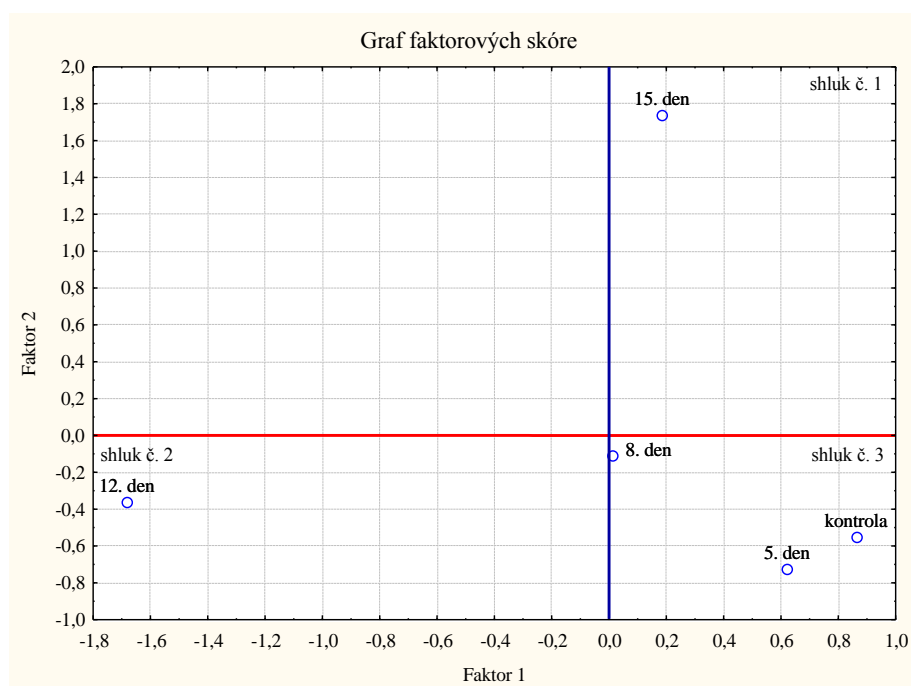
Obrázek č. 35: Graf faktorových zátěží



Převod jednotlivých pozorování do faktorového prostoru znázorňuje graf na obrázku č. 36. Je to výpočet hodnot faktoru č. 1 „stav vodního poměru rostlin krátkodobějšího charakteru“ a faktoru č. 2 „stav vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru“ pro jednotlivé odběry v čase. V tomto případě, tedy za podmínek vysychání, se rostliny ječmene Amulet chovaly v čase značně rozdílně. Podobné reakce vykazovaly jen rostliny v 1. a 2. odběru (kontrola a 5 dnů vysychání), a to i přes to, že rozdíl v obsahu vody mezi těmito odběry byl téměř 34 % PVK. V této fázi a za těchto podmínek však byly rostliny ještě schopny regulovat výdej vody. I mezi těmito odběry však lze vidět rozdíl, a to jednak v posunu pozorování „5. den“ ve faktorovém prostoru. Posun je jednak po ose X (faktor 1) směrem k nižším hodnotám, což značí změnu stavu vodního poměru rostlin krátkodobějšího charakteru, tedy nárůst obsahu DHN5 a zvýšení VSD. Posun po ose Y (faktor 2) směrem k nižším hodnotám značí změnu stavu vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru ve smyslu zvýšení  $\Delta^{13}\text{C}$ , tedy snížení diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  (dle výsledků ANOVA statisticky nevýznamný rozdíl). Rostliny odebrané 8. den experimentu již vykazovaly znatelnější rozdílnou reakci, i když rozdíl v obsahu vody substrátu oproti předešlému odběru činil jen 6,7 % PVK. Rostliny za těchto vlhkostních podmínek reagovaly zvýšením obsahu DHN5 a VSD (posun po ose X ve směru k nižším hodnotám) a snížením diskriminace  $^{13}\text{C}$  (posun po ose Y k vyšším hodnotám). Naproti tomu rostliny ječmene po 12 dnech vysychání, kdy obsah půdní vody dosáhl 35 % PVK, (snížení oproti předešlému odběru o 5,3 % PVK)

reagovaly zvýšením obsahu DHN5 a VSD, což značí posun k nejnižším hodnotám na ose X. Zásadní zvrat v reakci rostlin byl zaznamenán 15. den experimentu. Tomuto 4. odběru přecházelo vyrovnání půdní vlhkosti substrátu na 45 % PVK. Z grafu je patrné, že v oblasti vodního poměru rostlin dlouhodobějšího charakteru došlo k podstatnému snížení  $\Delta^{13}\text{C}$ , tedy za tohoto stavu rostliny využívaly dostupnou vodu neefektivněji v celé historii tohoto pokusu. Naopak v oblasti krátkodobého vodního režimu se rostliny dostaly k vyššímu faktorovému skóre.

Obrázek č. 36: Graf faktorových skóre



## 5.5 Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu

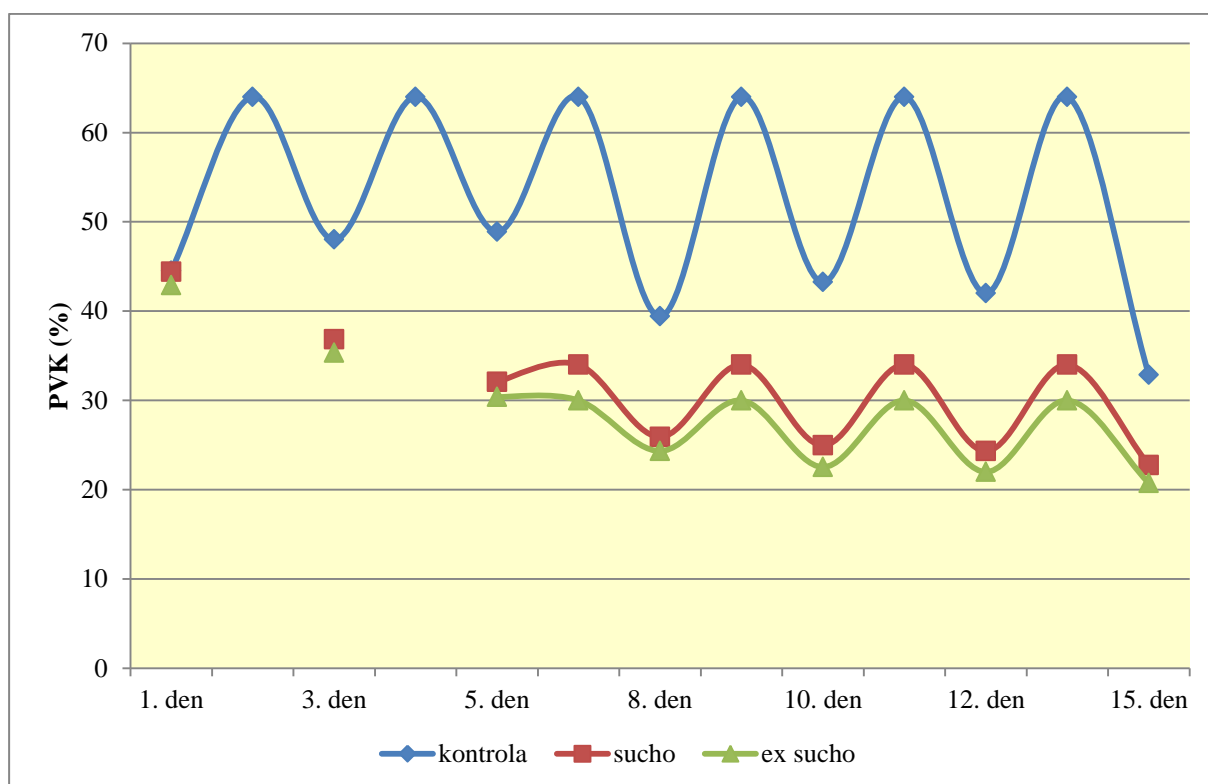
### 5.5.1 Dehydrinové a fyziologické analýzy

V experimentu byly analyzovány rostliny českých odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.) Amulet a Akcent, nizozemské Malz a syrské krajové odrůdy Tadmor, která je dobře adaptovaná na sucho (hlavně terminální). Rostliny Akcentu, Malzu a Tadmoru byly pěstovány ve dvou testovaných variantách, rostliny Amuletu ve třech variantách, lišící se obsahem vody v půdě.

Průběh vlhkosti substrátu znázorňuje graf na obrázku č. 37. Za první den pokusu je označen den, kdy byla započata diferencovaná zálivka, čím byly od sebe odlišeny tři testované varianty – a) „ExS“ extra sucho – 30 % PVK, b) „S“ sucho – 34 % PVK a c) „K“ kontrola – 64 % PVK (extra sucho bylo aplikováno jen u odrůdy Amulet). Rostliny byly ve

fázi plně vyvinutého druhého pravého listu (objevuje se 3. list) a byly vysety 18 dní před aplikací diferencované záливky. Obsah půdní vlhkosti klesnul na požadovanou hladinu varianty suché a extra suché 5 dní po aplikaci diferencované záливky. Rostliny extra suché a suché varianty byly na úrovni 30 %, resp. 34 % PVK pěstovány právě 10 dnů do odběru, který byl realizován 15. den.

Obrázek č. 37: Graf průběhu půdní vlhkosti při dlouhodobém pěstování rostlin za konstantního nasycení substrátu



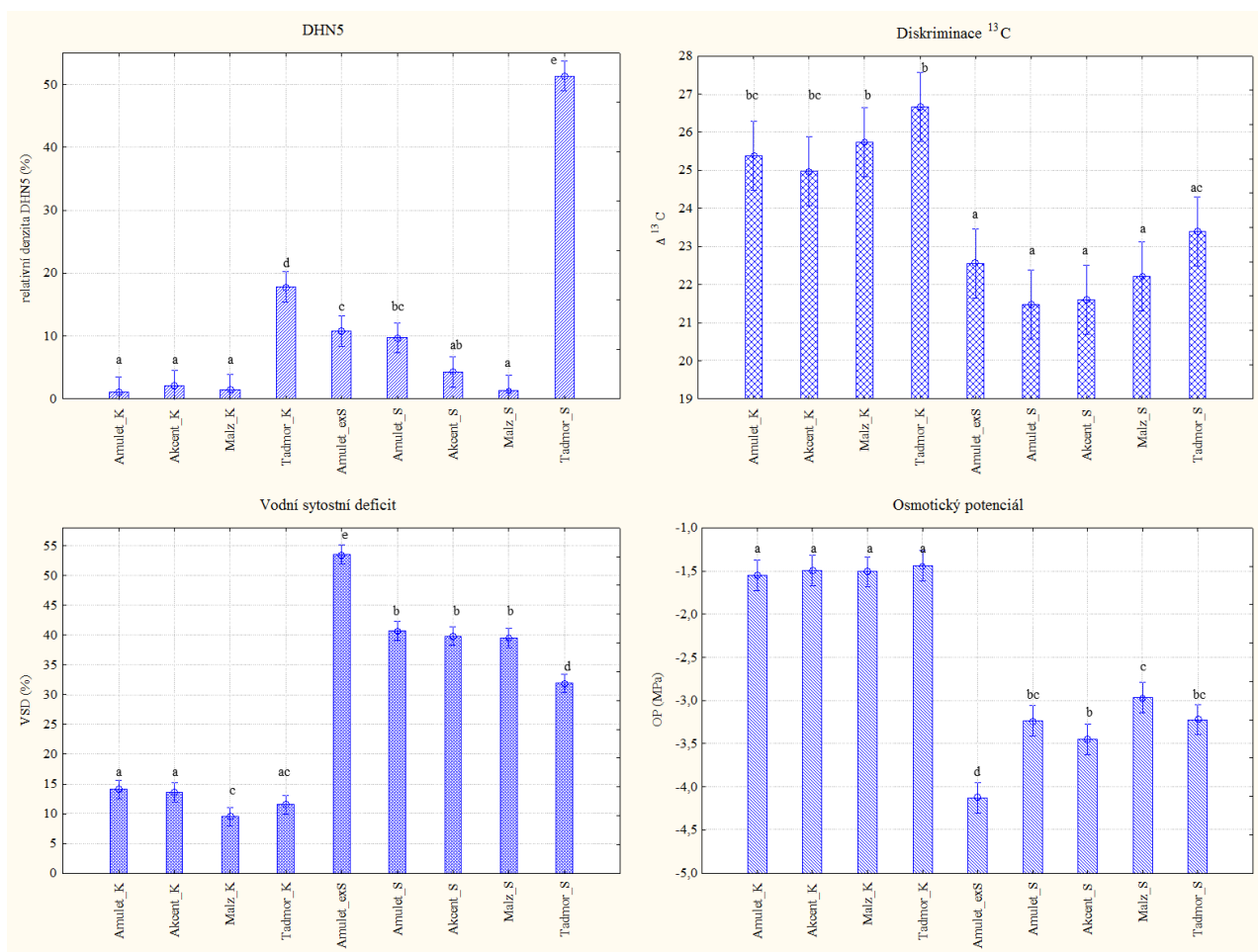
Výsledky měření vodního sytostního deficitu ukázaly, že v případě kontrolní varianty byl nejnižší deficit u odrůdy Malz (9,5 %) společně s Tadmorem (11,5 %). U stresovaných variant byla statisticky významně odlišná varianta extra sucha odrůdy Amulet od všech ostatních odrůd, což je logické zjištění. V režimu 34 % PVK byla touto charakteristikou odlišena jen odrůda Tadmor (31,9 %). Amulet (40,7 %), Akcent (39,8 %) a Malz (39,5 %) nevykazovaly v této charakteristice statisticky významný rozdíl. Osmotický potenciál nevykazoval u kontrolní varianty statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými odrůdami, zatímco u stresovaných variant bylo možno pozorovat různé osmotické přizpůsobení odrůd. Zajímavé je, že hodnota OP u Malzu\_K (-1,51 MPa) se statisticky významně neliší od ostatních odrůd kontrolní varianty, i když VSD této odrůdy se statisticky významně lišilo od

Amuletu\_K a Akcentu\_K. Znamená to tedy, že tato odrůda byla osmoticky přizpůsobena shodně, jako odrůdy ostatní, a to i za toto faktu, že vykazovala nejnižší VSD. Z pohledu efektivity využití vody byla odrůda Malz (Malz\_K 25,72 ‰; Malz\_S 22,21 ‰) tendenčně průměrná (ovšem statisticky významně se nelišila od ostatních testovaných odrůd, a to jak v kontrolní variantě, tak ani ve variantě suché). Zajímavé je zjištění, že relativní obsah DHN5 se u Malzu statisticky významně nelišil mezi variantami suchou a kontrolou.

Obsah vody v rostlinách odrůdy Tadmor, které byly pěstovány za sucha, byl nejvyšší, a to shodně s předešlými pokusy (vykazovaly tedy nejnižší VSD). OP byl však na úrovni -3,22 MPa, a to statisticky významně shodně s Amuletem\_S a Malzem\_S, což značí fakt, že odrůda Tadmor byla lépe osmoticky aklimatizovaná na suchu. Podle naměřených experimentálních dat je tento fakt zřejmě způsoben vysokou akumulací dehydrinových proteinů, které jsou jedním z mechanismů osmotického přizpůsobení rostlin. Z hlediska diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$ , vykazovala tato odrůda tendenčně nejvyšší hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$  (23,4 ‰), i když se statisticky významně neliší od ostatních testovaných odrůd pěstovaných za sucha. Zajímavé je zjištění, že v hodnotě parametru  $\Delta^{13}\text{C}$  se odrůda Tadmor pěstovaná za sucha statisticky významně nelišila oproti odrůdám Amulet a Akcent kontrolní varianty. I tento pokus potvrdil závěry předešlých experimentů ve směru vysoké akumulace dehydrinových proteinů, resp. DHN5. Například v kontrolní variantě byl relativní obsah DHN5 Tadmoru 12,1 krát vyšší ve srovnání s Malzem, nebo 16,3 krát vyšší než u odrůdy Amulet. U suché varianty byl obsah DHN5 odrůdy Tadmor 38,3 krát vyšší než u Malzu a 5,3 krát vyšší ve srovnání s Amuletem.

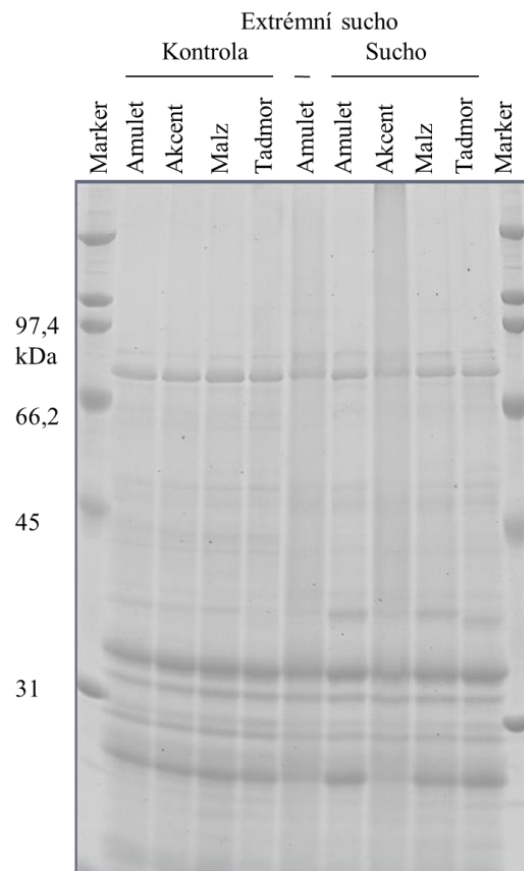
Odrůda Amulet vykazovala v kontrolní variantě 14 % VSD, v suché variantě potom 40,7 % a v extra suché variantě 53,5 %. Osmotický potenciál byl u kontrolní varianty roven hodnotě -1,55 MPa, u suché varianty -3,24 MPa a u extra suché varianty -4,12 MPa. Zajímavé je, že se zvyšujícím se vodním deficitem současně docházelo ke snižování osmotického potenciálu extra suché varianty Amuletu (30 % PVK), ovšem nikoli už ke zvyšování akumulace dehydrinových proteinů. Relativní obsah DHN5 byl téměř shodný se suchou variantou Amuletu. Dalším zjištěním bylo to, že rostliny extra suché varianty diskriminovaly izotop  $^{13}\text{C}$  tendenčně více, než rostliny suché varianty (i když statisticky významně se hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$  nelišily). Zdá se tedy, že za těchto vlhkostních poměrů již rostliny nedokázaly zvyšovat efektivitu využití vody, spíše naopak, účinnost využití vody se za extra podmínek sucha (VSD 53,5 %) tendenčně snižovala.

Obrázek č. 38: Grafy znázorňující a) akumulaci DHN5, b) diskriminaci  $^{13}\text{C}$ , c) VSD, a) OP – modifikováno z Škodáček et Prášil (2011)



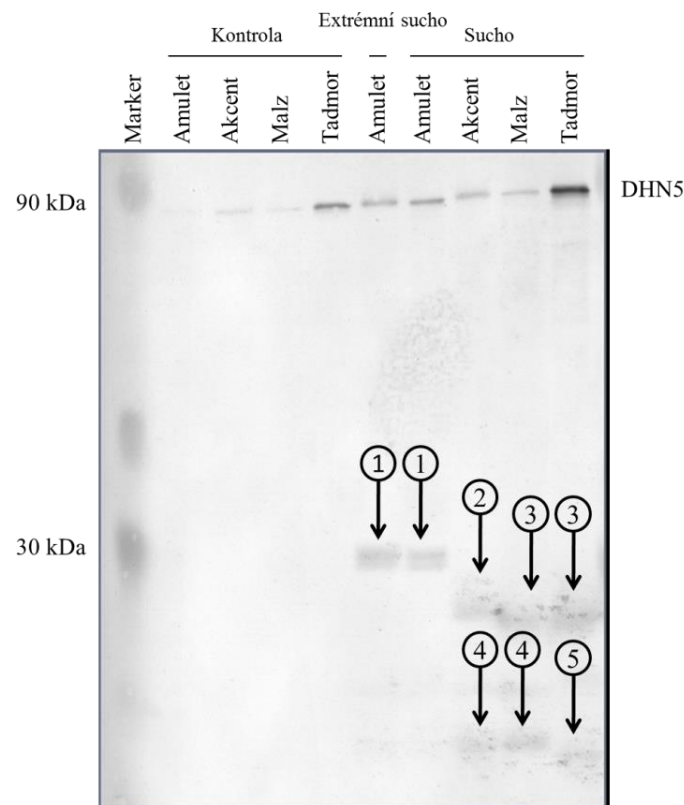
V případě stresových variant (25 % PVK a 30 % PVK) bylo za pomoci imunologické metody detekováno nejméně šest různých dehydrinových proteinů, které jsou na obrázku č. 40 označeny šipkami. Jako nejvíce abundantní dehydrinový protein se jeví být DHN5, který je současně dehydrin s nejvyšší molekulovou hmotností (58,5 kDa), a jehož gen *Dhn5* je lokalizován na chromosomu 6H (Close *et al.*, 1995). V tomto experimentu byly potvrzeny předešlé výsledky (Škodáček *et al.* 2010b), které ukazují na minimální expresi a akumulaci vysokomolekulárního dehydrinu DHN5 i za normálních fyziologických podmínek (obrázek č. 38 – kontrolní varianta).

Obrázek č. 39: Jednorozměrná elektroforéza proteinů rozpustných po varu – převzato z Škodáček et al., (2010) a Škodáček et Prášil (2011)



K odlišení jednotlivých testovaných odrůd bylo použito denzitometrické hodnocení obsahu DHN5 (graf denzity DHN5 na obrázku č. 38 a obrázek č. 40). Statisticky významný rozdíl v akumulaci DHN5 mezi testovanými odrůdami byl v kontrolní variantě zaznamenán jen u syrské odrůdy Tadmor, ostatní genotypy nebylo možné od sebe odlišit. Naproti tomu u stresované varianty bylo možné statisticky signifikantně odlišit odrůdy Amulet/Akcent, Malz a Tadmor. Dalším zjištěním bylo, že u všech zkoumaných genotypů vystavených stresu suchem byla pozorována indukce exprese a akumulace různých typů nízkomolekulárních dehydrinů s různým zastoupením u jednotlivých odrůd.

Obrázek č. 40: Imunoblot s vizualizovanými dehydrinovými proteiny – převzato z Škodáček et al., (2010) a Škodáček et Prášil (2011)

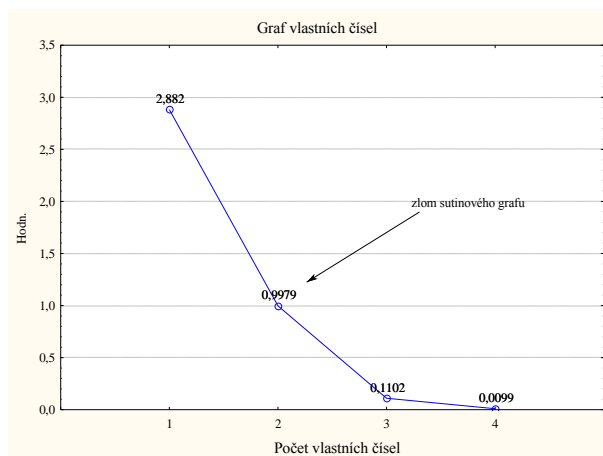


### 5.5.2 Faktorová analýza

K vyšetření vnitřních souvislostí a vztahů a odhalení základní struktury matice dat byla použita jako v předešlých případech faktorová analýza. Vypočtená vlastní čísla lze interpretovat jako celkový rozptyl proměnných a % celkového rozptylu, které daný faktor vysvětluje z celkového 100 % rozptylu. První dvě vlastní čísla vysvětlují 96 % z celkového rozptylu. Dle výsledků Cattelova indexového grafu úpatí vlastních čísel je významný počet faktorů roven dvěma (obrázek č. 41).



Obrázek č. 41: Graf vlastních čísel



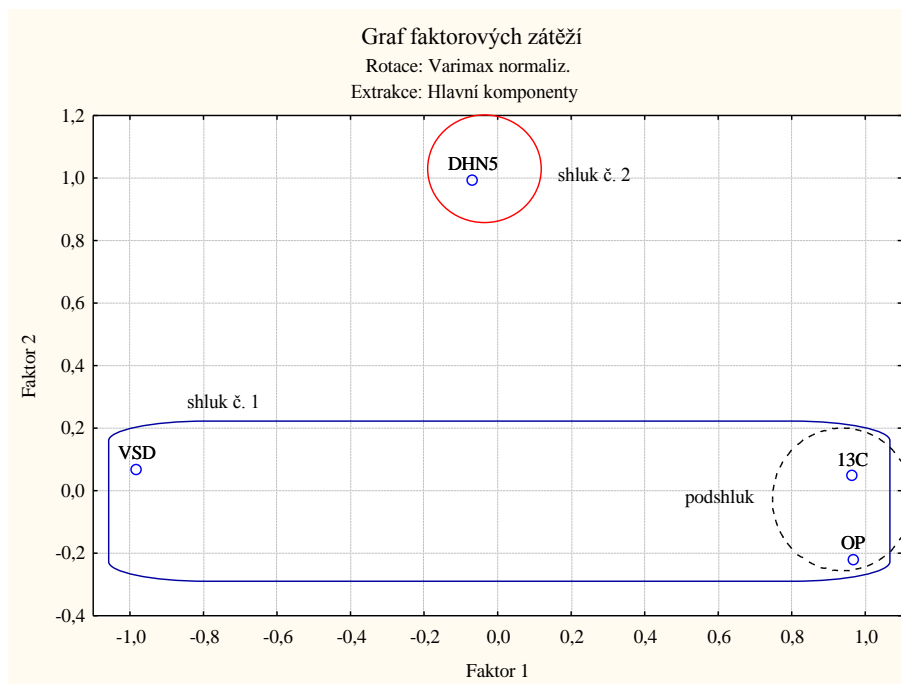
Z faktorových zátěží, které uvádí tabulka č. 16 je zřejmá korelační struktura faktorových proměnných. První faktor koreluje s proměnnými  $\Delta^{13}\text{C}$ , OP a VSD. Druhý faktor potom významně koreluje s DHN5. Faktor č. 1 vytváří třídu tří proměnných, které jsou navzájem úměrné, přičemž proměnná VSD je nepřímo úměrná s proměnnými  $\Delta^{13}\text{C}$  a OP, které jsou navzájem v přímé korelaci.

Tabulka č. 16: Faktorové zátěže

Faktor, zátěže (Varimax normaliz.) Extrakce: Hlavní komponenty		
Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
DHN5	-0,06958	0,996259
$^{13}\text{C}$	0,962246	0,049415
OP	0,965803	-0,21749
VSD	-0,98446	0,070077

Při promítnutí faktorových zátěží jednotlivých proměnných do faktorové roviny je viditelné, že všechny proměnné mají vysokou faktorovou zátěž buď k jednomu, nebo ke druhému faktoru, přičemž  $\Delta^{13}\text{C}$ , VSD a OP tvoří shluk č. 1 a DHN5 je v grafu na obrázku č. 42 označen jako shluk č. 2. Z grafu je zřejmé, že OP a  $\Delta^{13}\text{C}$  stojí velmi blízko u sebe, z toho je patrný velmi podobný průběh těchto dvou charakteristik. To je velice zajímavé zjištění, neboť kontrolní varianty, které vykazují oproti variantám stresovaným vyšší OP, vykazují také vyšší diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$  a naopak, stresované varianty vykazují nižší OP (vyšší VSD) a nižší diskriminaci izotopu  $^{13}\text{C}$ . Naopak charakteristiky OP a VSD stojí v protilehlých kvadrantech, což značí fakt, že jsou navzájem nepřímo úměrné. To je logické, neboť ztráta vody z buněk je spouštěcím mechanismem pro syntézu osmoticky aktivních látek. Naproti tomu charakteristiku DHN5 lze označit jako unikátní, neboť nekoreluje s žádnou měřenou fyziologickou charakteristikou a jako jediná signifikantně ovlivňuje faktor č. 2.

Obrázek č. 42: Graf faktorových zátěží

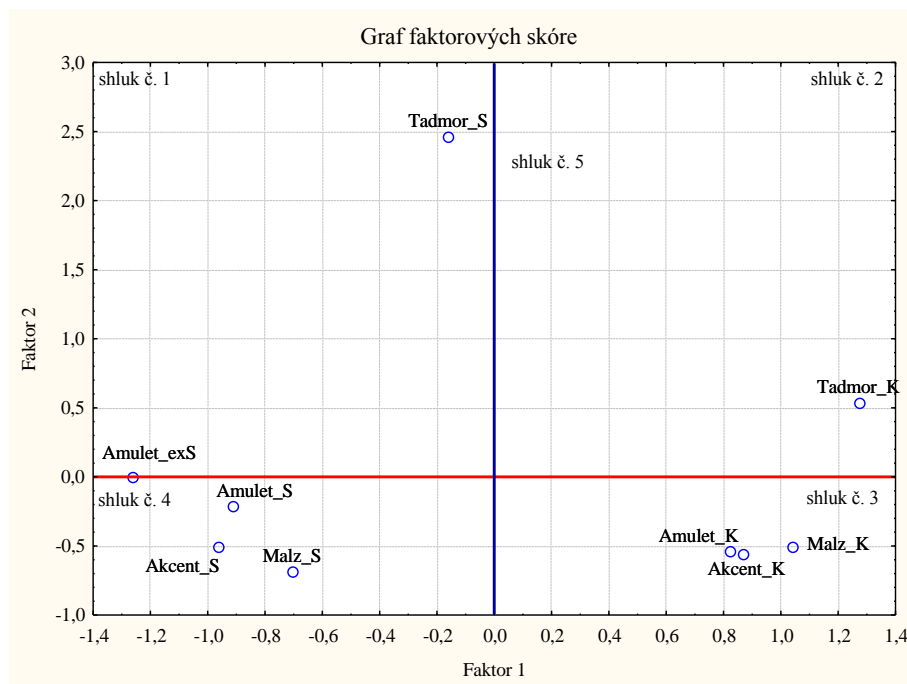


Z grafu faktorových skóre (obrázek č. 43) je zřetelné, že z kontrolní varianty vybočovala svým chováním jen odrůda Tadmor, a to zejména v charakteristice akumulace DHN5, nicméně i v oblasti reakce odrůd popisovanými ostatními měřenými charakteristikami reagovala tato odrůda odlišně od ostatních. Co se týče Amuletu a Akcentu, jejich chování za kontrolních podmínek bylo téměř totožné. Posun v oblasti faktoru č. 1 bylo zaznamenáno u kontrolní varianty Malzu. Odrůda Malz měla oproti Amuletu a Akcentu statisticky významně nižší VSD, v ostatních charakteristikách nebyly statisticky významné rozdíly.

Odrůdy suché varianty se v grafu nacházejí v druhé polovině. V rámci této suché varianty je znatelný rozdíl v distribuci proměnných ve faktorovém prostoru. Je pochopitelné, že nejnižší faktorové skóre k 1. faktoru má odrůda Amulet\_exS, která byla pěstována za extra sucha (30 % PVK). Je to logické, neboť má nejvyšší VSD a nejnižší OP. Co se týče charakteristiky  $\Delta^{13}\text{C}$ , Amulet\_exS vykazoval zvýšenou míru této vlastnosti, což je zajímavé zjištění. Je pravděpodobné, že při tak vysoké ztrátě vody nedokáží již rostliny efektivně využívat vodu, spíše naopak, parametr  $\Delta^{13}\text{C}$  narůstá, na základě čehož se lze domnívat, že v těchto podmínkách rostlina dosáhla biologického stropu efektivního využití vody. Suchá varianta odrůdy Tadmor se opět chovala odlišně od ostatních testovaných odrůd. Z hlediska faktorového skóre vykazovala tato odrůda nejvyšší hodnotu ve 2. faktoru. Co se týče faktorového skóre této odrůdy 1. faktoru, pohybovala se tato odrůda na pomezí suché a kontrolní varianty. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky předešlých výzkumů.

Ostatní testované odrůdy v rámci suché varianty jsou rozloženy ve III. kvadrantu, a to jak podle 1. tak i podle 2. faktoru. Z pohledu této disertační práce je relevantnější informace o faktorovém skóre 2. faktoru. Z tohoto důvodu je velmi důležité zjištění, že odrůdy byly dle faktoru č. 2 rozděleny, navíc podle výsledků ANOVA byly zjištěny statisticky významné rozdíly v akumulaci DHN5.

Obrázek č. 43: Graf faktorových skóre



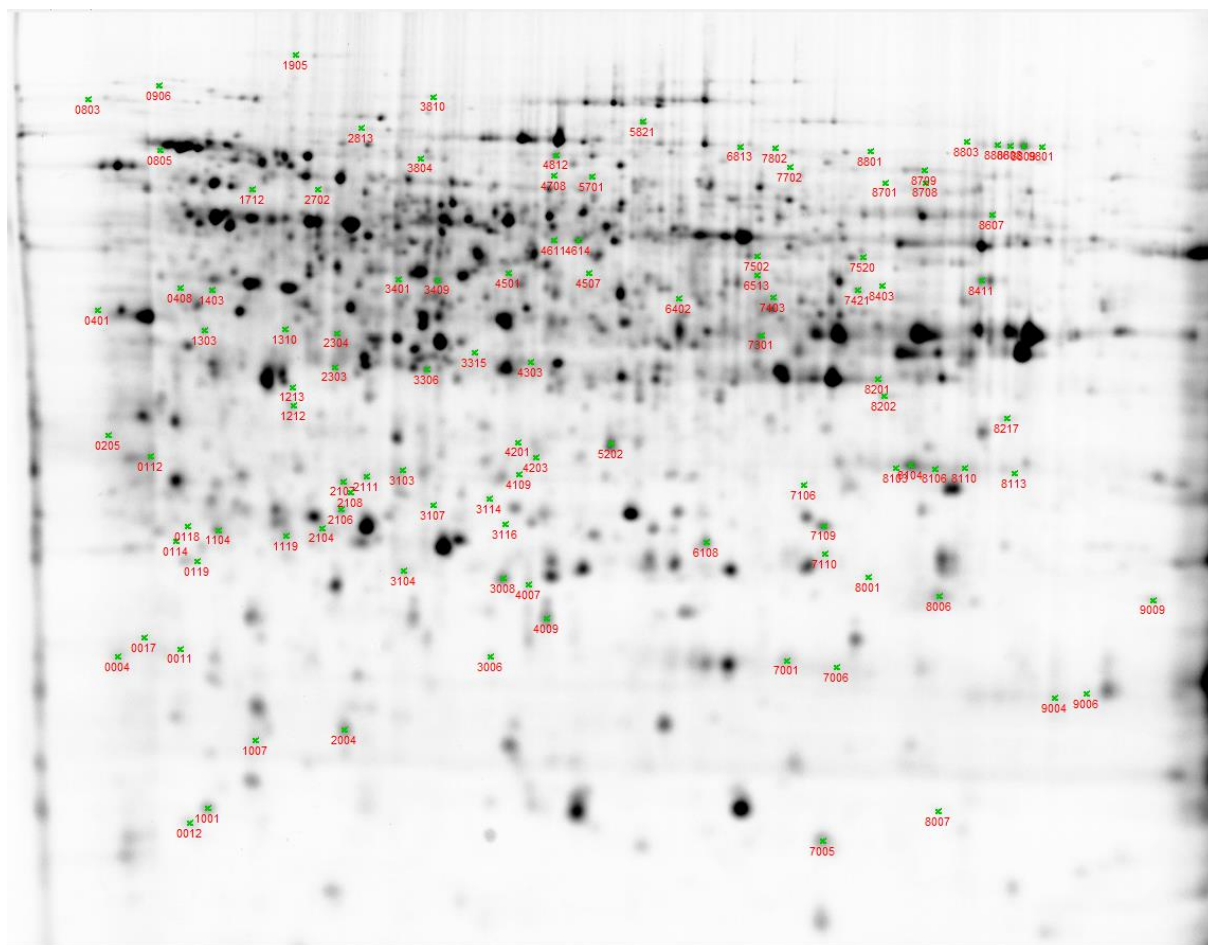
### 5.5.3 Diferenční gelová elektroforéza – 2-D-DIGE

K proteomickým analýzám byly využity rostliny ječmene odrůdy Amulet, které byly pěstovány v rámci pokusu „Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu“. Rozdílem oproti testování abundance dehydrinových proteinů a s tím spojených fyziologických analýz bylo, že pro proteomické analýzy bylo k extrakci totálních proteinů použito pletivo z odnožovacích uzlů rostlin, čímž byl minimalizován obsah Rubisca.

Na gelech bylo rozlišeno přibližně 900 proteinových skvrn.

Kvantitativní obrazová analýza provedená programem PDQuest odhalila 106 diferenciólně akumulovaných proteinových spotů, tedy těch, jejichž abundance se lišila podle Studentova t-testu ( $\alpha = 0,05$ ) nejméně dvakrát mezi srovnávanými vzorky (obrázek č. 44). Tyto proteinové skvrny byly vyřezány (Spot Cutter, Bio-Rad) k následným identifikacím.

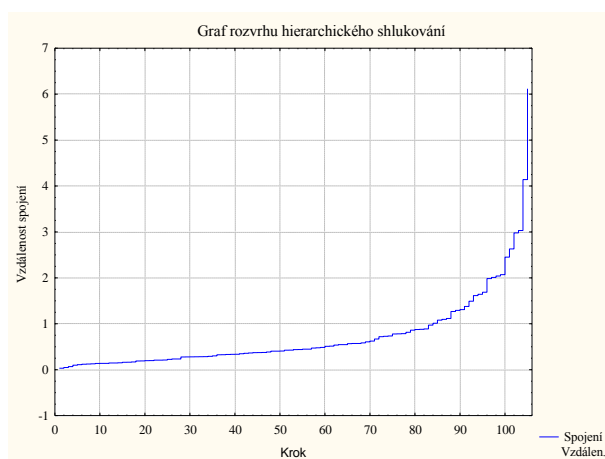
Obrázek č. 44: Diferenciálně akumulované proteinové skvrny (106)



Abundance těchto 106 rozdílně se akumulujících proteinových skvrn byla podrobena testování pomocí shlukové analýzy, která se zabývá vyšetřováním podrobností vícerozměrných objektů a jejich klasifikací do tříd čili shluků (Meloun *et al.*, 2005). V rámci této disertační práce byla použita metoda hierarchického shlukování úplného spojování (metoda nejbližšího souseda).

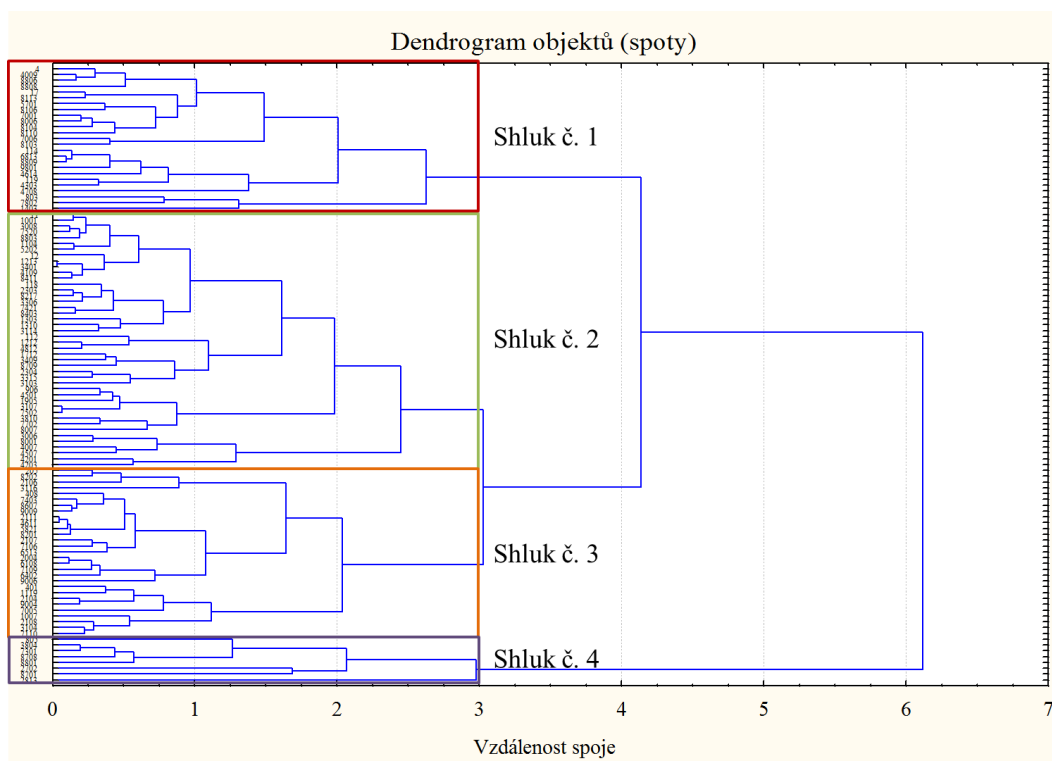
Jako vodítko pro tvorbu nejvhodnějšího počtu shluků bylo využito grafu rozvrhu shlukování (obrázek č. 45), který ukazuje skoky mezi vzdálenostmi objektů, které je nutné překonat pro jejich spojení. Největší skok je zaznamenán v posledním kroku, tedy jako vhodné se jeví vytvořit čtyři shluky.

Obrázek č. 45: Graf rozvrhu hierarchického shlukování



Z dendrogramu podobnosti objektů (obrázek č. 46) lze zjistit složení shluků po provedení vertikálního řezu na úrovni vzdálenosti 3, neboť tento řez prochází právě čtyřmi spojovacími čarami.

Obrázek č. 46: Dendrogram klasifikace proteinů do shluků



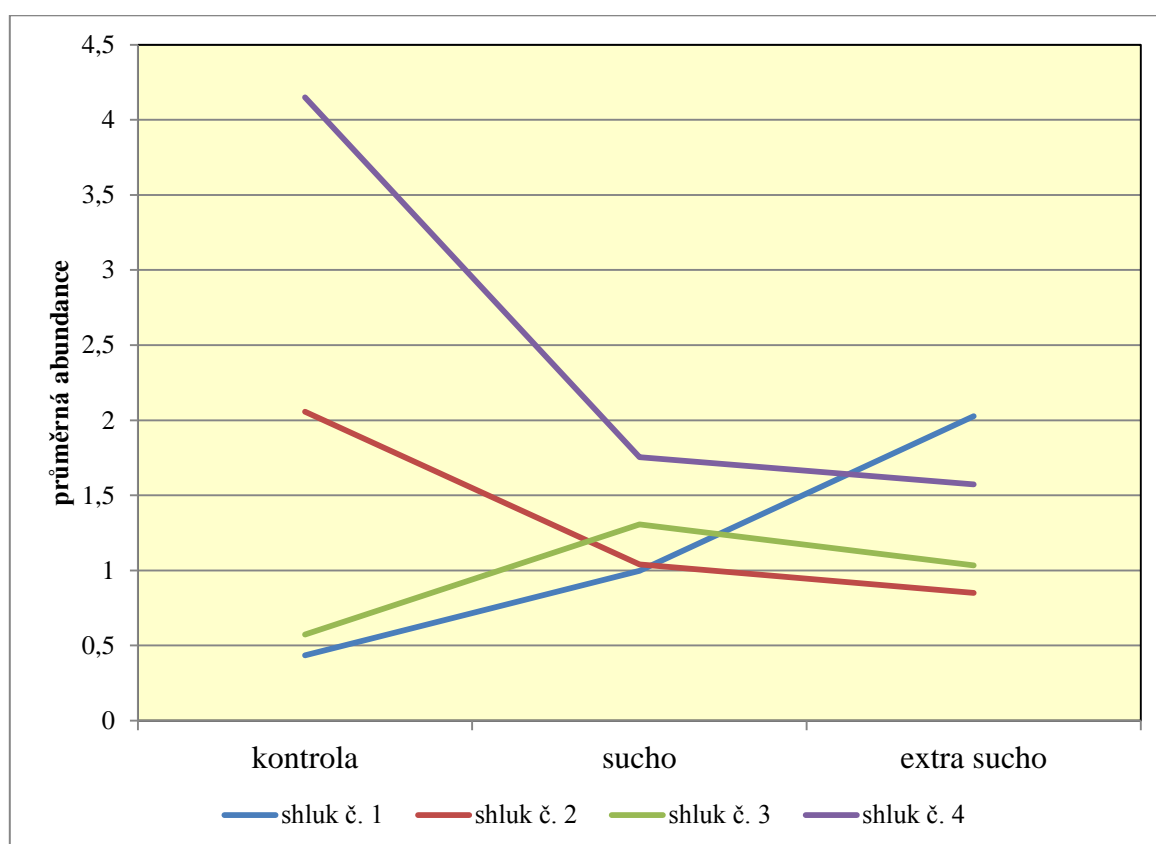
Členy shluků včetně jejich odhadované molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) a izoelektrického bodu (pI) jsou uvedeny v Příloze č. 3. Z dendrogramu objektů (obrázek č. 46) je patrné, že

160 proteinových spotů bylo klasifikováno do čtyř shluků, přičemž shluk č. 4 zahrnuje 8 proteinů, které se abundancemi výrazně liší od ostatních.

Graf na obrázku č. 47 ukazuje průměrný trend akumulace proteinů v rámci jednotlivých shluků za extra sucha, sucha a kontroly.

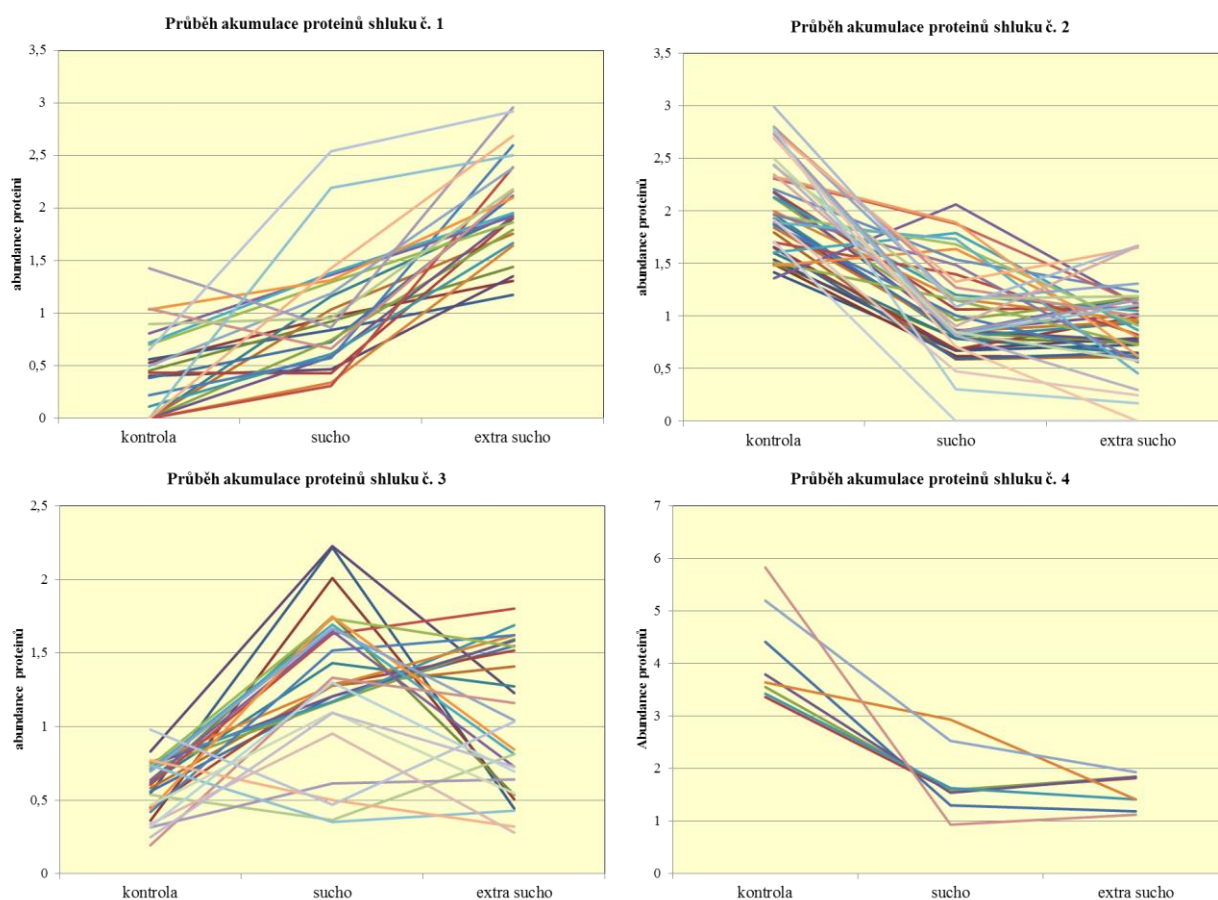
Shluk č. 1 (25 proteinů) obsahuje proteiny, jejichž abundance stoupala od kontrolní varianty přes sucho až k extra suchu. Z tohoto důvodu se lze domnívat, že tyto proteiny plní důležitou úlohu v době, kdy je rostlina vystavena stresu suchem.

*Obrázek č. 47: Graf průměrného trendu akumulace proteinových spotů v rámci jednotlivých shluků*



Proteiny shluků č. 2 (44 proteinů) a č. 4 (8 proteinů) mají stejný tendenční průběh akumulace (kontrola – sucho – extra sucho). Zásadním rozdílem je abundance proteinů shluku č. 4, které vykazují v kontrolní variantě vysokou akumulaci, přičemž v suché variantě došlo k jejich dramatickému poklesu. V extra suché variantě poté došlo k dalšímu mírnému poklesu abundance těchto proteinů, ten však nebyl zdaleka tak dramatický. Průběh akumulace proteinů shluku č. 2 měl také snižující se trend, nicméně abundance těchto proteinů v kontrole byla nižší.

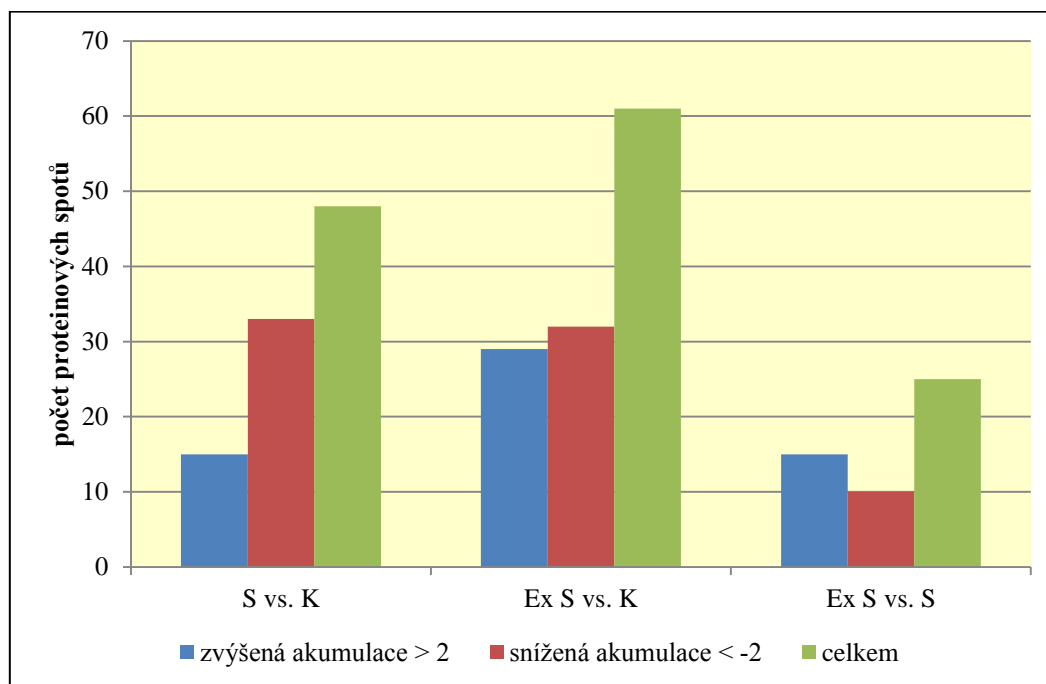
Obrázek č. 48: Grafy akumulace proteinů zařazených v jednotlivých klastrech



Shluk č. 3 (29 proteinů) má zvláštní průběh, neboť křivka abundance určitých proteinů dosahuje svého maxima ve variantě sucha a ve variantě extra sucha dochází k mírnému poklesu. To znamená, že s postupujícím suchem již nedochází k nárůstu akumulace těchto proteinů.

Diferenciálně akumulované proteinové spoty (106), které byly vybrány pomocí programu PDQuest, byly podrobeny dalšímu statistickému zkoumání. Pro detailnější studii byly abundance proteinových spotů jednotlivých variant pokusu (kontrola, sucho, extra sucho), mezi sebou porovnány poměrem, tedy sucho/kontrola, extra sucho/kontrola a extra sucho/ sucho. Statistická signifikance těchto poměrů byla ověřena t-testem ( $\alpha = 0,05$ ), přičemž bylo dále kalkulováno jen se spoty, jež se lišily ve své abundanci mezi variantami nejméně 2 krát. Výsledky tohoto statistického šetření znázorňuje graf na obrázku č. 49 a vlastní poměry jsou uvedeny v Příloze č. 4.

Obrázek č. 49: Počet statisticky významně diferencovaných proteinových spotů mezi testovanými variantami



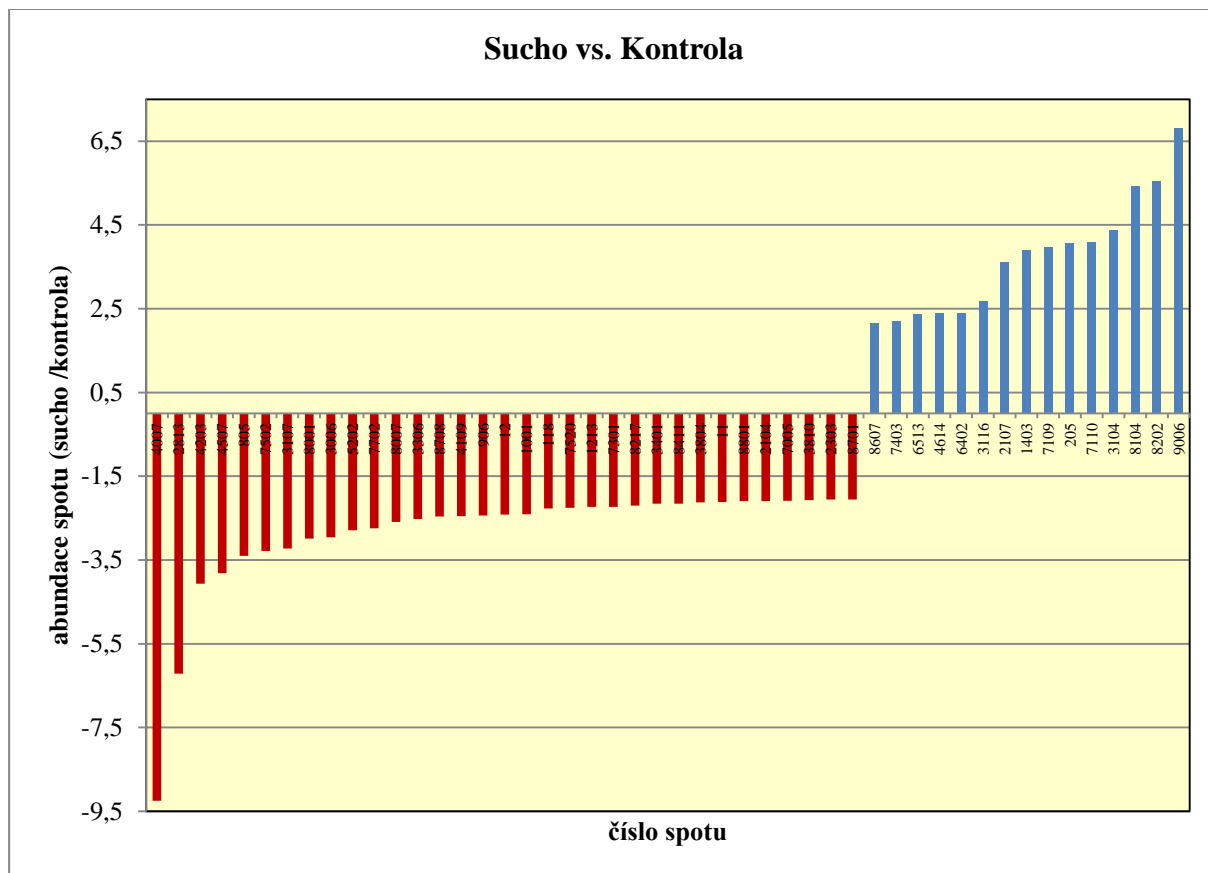
Je patrné, že největší množství statisticky významně diferencovaných proteinů bylo nalezeno mezi variantami extra sucho a kontrola (61 proteinů), přičemž z toho bylo 29 proteinů se zvýšenou akumulací a 32 proteinů se sníženou akumulací. Graf na obrázku č. 50 znázorňuje poměry mezi abundancemi jednotlivých proteinových spotů u extra sucha a kontroly. Červeně jsou vyznačeny proteiny, jejichž abundance byla v extra suché variantě oproti kontrole snížena (naopak v kontrolní variantě vykazovaly tyto proteiny zvýšenou koncentraci oproti extra suchu). Modře jsou potom vyznačeny proteiny, jejichž akumulace se při suchu významně zvýšila. Jako zajímavý je možné považovat spot č. 4007, který vykazuje 16,7 krát sníženou akumulaci při zatížení rostlin extra suchem oproti kontrole, dále pak spot č. 8001, jehož akumulace byla snížena při extra suchu 8,3 krát, dále pak spot č. 4203, jehož koncentrace byla při extra suchu oproti kontrole snížena 7,9 krát a spot č. 2813, jehož koncentrace se snížila 5,2 krát. Naopak z pohledu zvýšení koncentrace je zajímavý spot č. 9006, jehož abundance se zvýšila u extra sucha 5,9 krát, spot č. 7006, který byl za extra sucha akumulován 11,7 krát více, dále pak spot č. 8104, jehož koncentrace vzrostla u rostlin pěstovaných za extra sucha 14,7 krát.





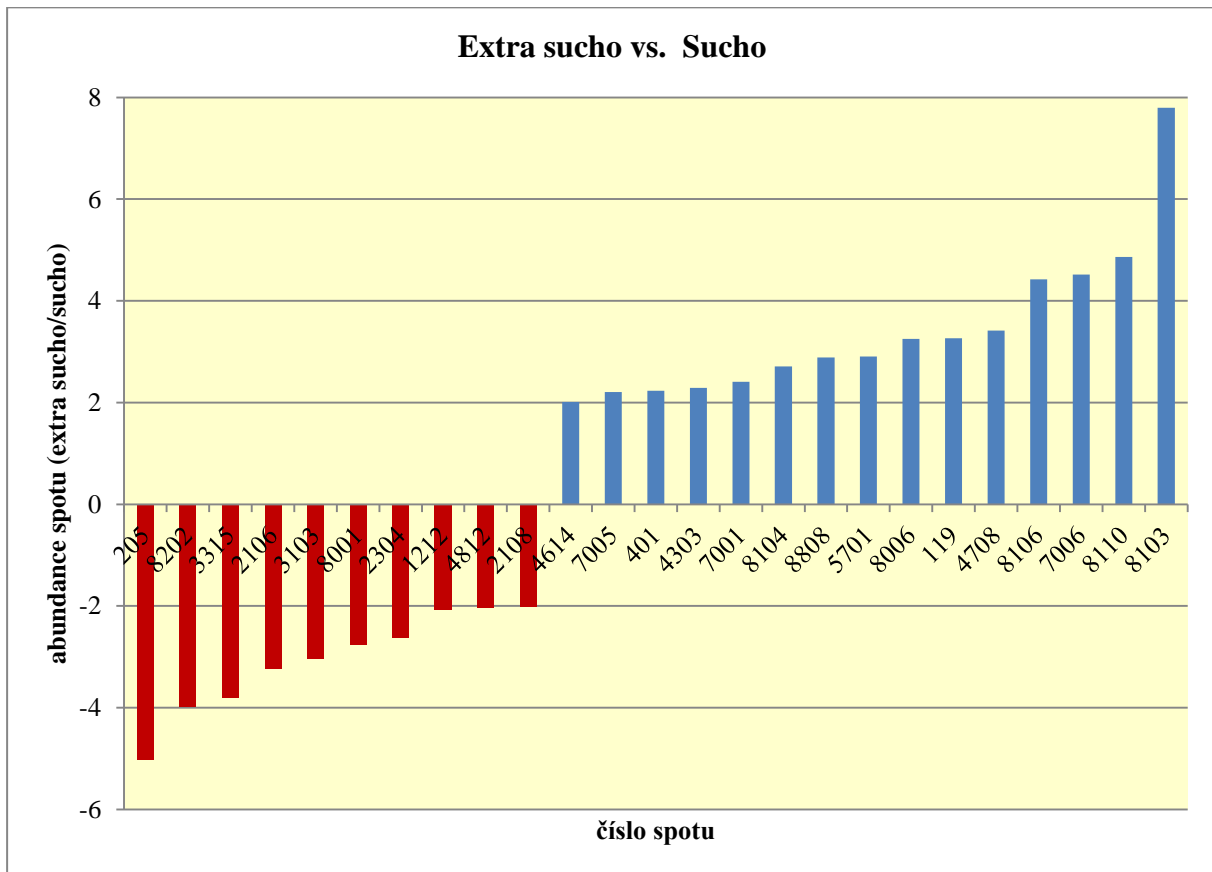
8202, jehož koncentrace se zvýšila 5,54 krát a spot č. 8104, jehož akumulace se zvýšila při suchu 5,4 krát (při extra suchu se zvýšila koncentrace tohoto proteinu 14,7 krát).

*Obrázek č. 51: Statisticky významné poměry akumulace proteinů u variant sucho/kontrola*



Nejméně dramatické kvantitativní změny byly zaznamenány u poměru extra sucho a sucho. Z celkového počtu 25 statisticky signifikantně diferencovaných spotů (poměrů) jich 15 vykazovalo zvýšenou a 10 sníženou abundanci. Dynamika těchto proteinů tedy odráží změny v proteomu při porovnání extra sucha a sucha (obrázek č. 52).

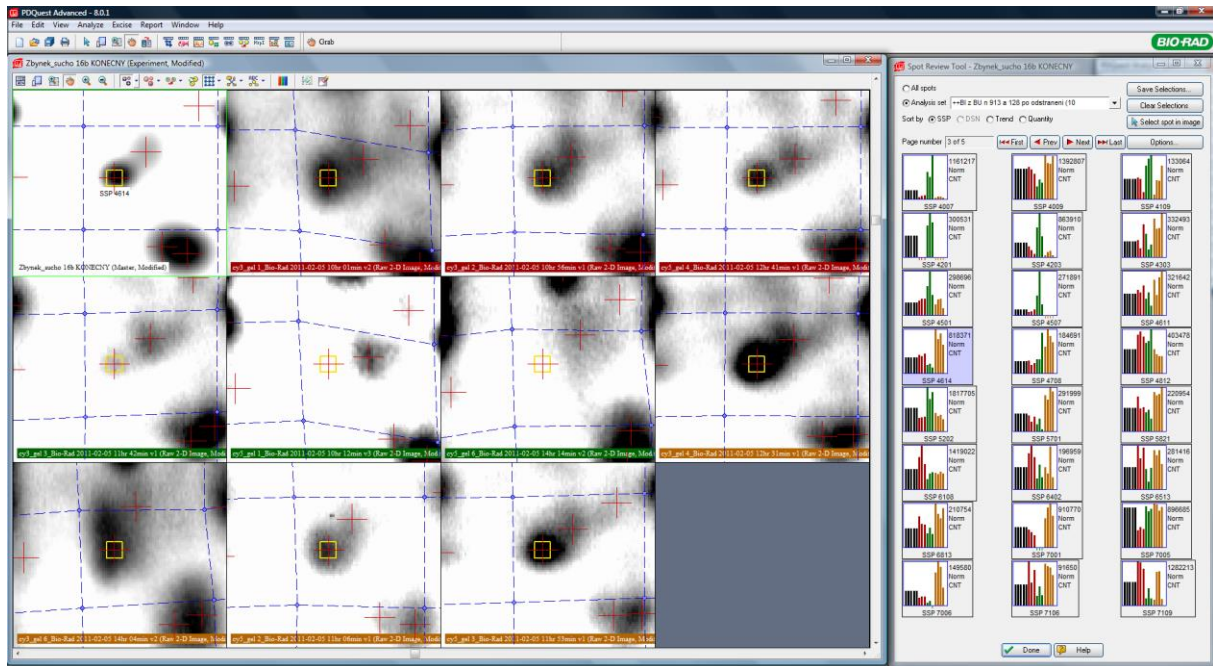
Obrázek č. 52: Statisticky významné poměry akumulace proteinů u variant extra sucho/ sucho



Všechny proteiny, u nichž dochází k signifikantním změnám v jejich akumulaci za různých vodních poměrů, jsou velice zajímavé, neboť jimi rostlina reaguje na prostředí, v němž roste a vyvíjí se.

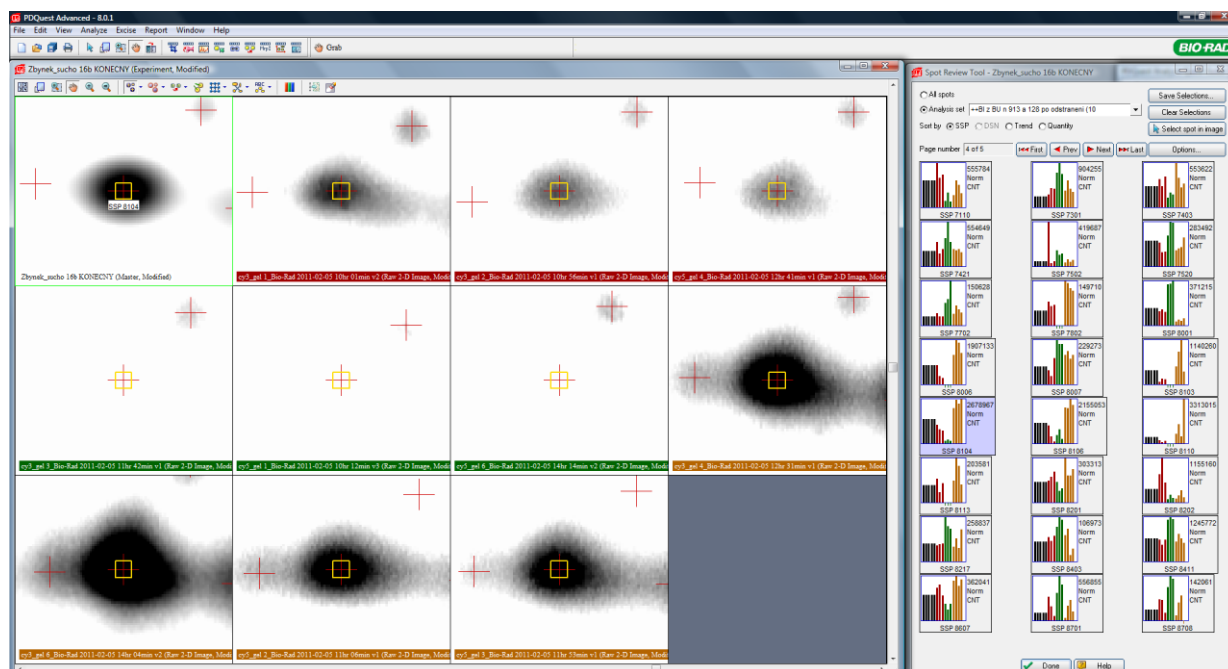
Proteiny, které by mohly sloužit jako proteomické markery suchovzdornosti, by měly vykazovat určitý trend akumulace za kontrolních, stresujících a extrémně stresujících podmínek. Jinými slovy, pomocí těchto proteinů by měli být šlechtitelé schopni odlišit od sebe jednotlivé genotypy při různé intenzitě stresových podmínek. Graf na obrázku č. 56 znázorňuje porovnání všech signifikantně akumulujících se proteinů (více nebo méně než 2 krát mezi variantami). Jako velice perspektivní se v oblasti markerování může jevit protein označený číslem 4614 (na obrázku č. 56 označen modrou šipkou). Koncentrace tohoto proteinu se statisticky signifikantně zvyšovala, a to tak, že v suchu se zvýšila koncentrace tohoto proteinu 2,4 krát, v extra suchu potom 4,8 krát oproti kontrole a koncentrace tohoto proteinu byla v extra suché variantě 2 krát zvýšená oproti suchu.

Obrázek č. 53: Detail proteinové skvrny č. 4614 (červeně označeno sucho, zeleně kontrola, oranžově extra sucho)



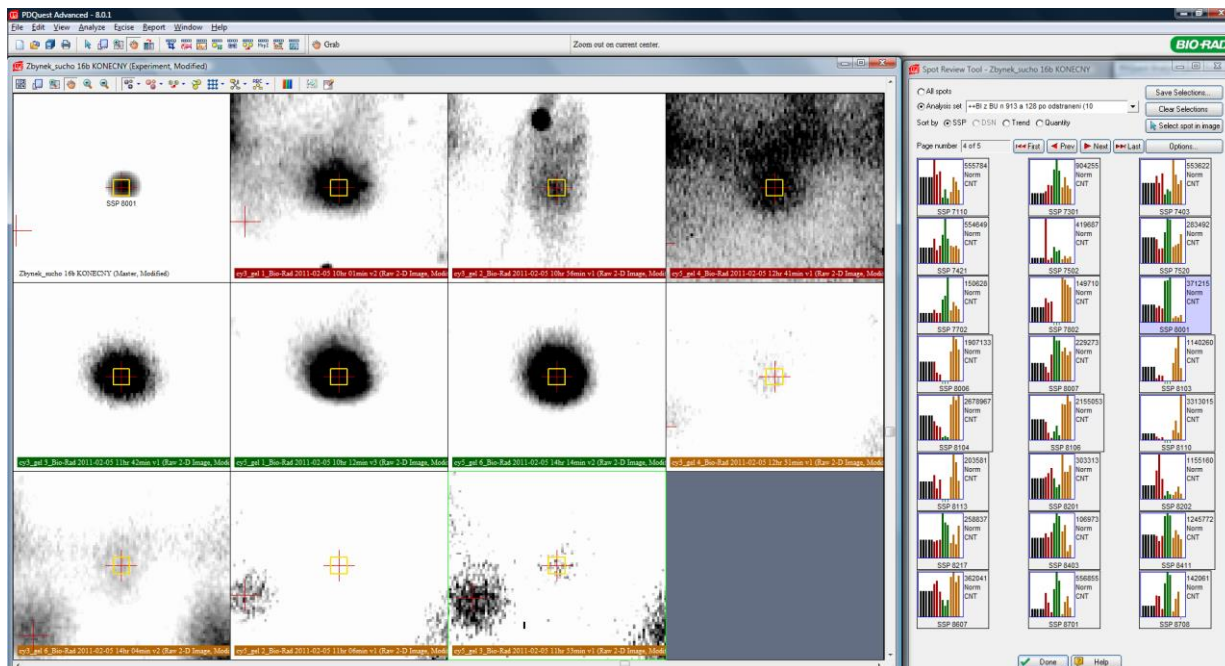
Dalším velice zajímavým proteinem v oblasti markerů by mohl být protein č. 8104 (na obrázku č. 56 označen červenou šipkou), který vykazoval zvýšení abundance v suchu 5,4 krát, v extra suchu 14,7 krát a v extra suchu byl zvýšen obsah tohoto proteinu 2,7 krát oproti suchu. Naproti tomu protein č. 7006 (na obrázku č. 56 označen oranžovou šipkou) by dle těchto parametrů zřejmě byl méně dobrým markerem suchovzdornosti, a to navzdory jeho vysoké akumulaci při extrémním suchu. Problémem je, že byt byla zaznamenána zvýšená akumulace tohoto proteinu v suchu, nebylo toto zvýšení potvrzeno t-testem, a tedy nebylo statisticky významné. Toto tvrzení by se ovšem muselo otestovat na větší škále genotypů. Pokud by byl tento princip vztáhnut na aplikovaný marker suchovzdornosti DHN5, jehož obsah byl za pomoci imunologické metody měřen i u rostlin jednotlivých variant tohoto pokusu (viz obrázek č. 38), lze prohlásit, že za pomoci měření akumulace tohoto markeru nebylo možno odlišit variantu sucho a extra sucho. Byl tedy zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi obsahem DHN5 v kontrolní a suché variantě, nikoli však už mezi suchou a extra suchou variantou. Z tohoto pohledu lze markerovací proteiny, jejichž akumulace vzrůstá či klesá s intenzitou stresu, považovat za užitečnější.

Obrázek č. 54: Detail proteinové skvrny 8104 (červeně označeno sucho, zeleně kontrola, oranžově extra sucho)



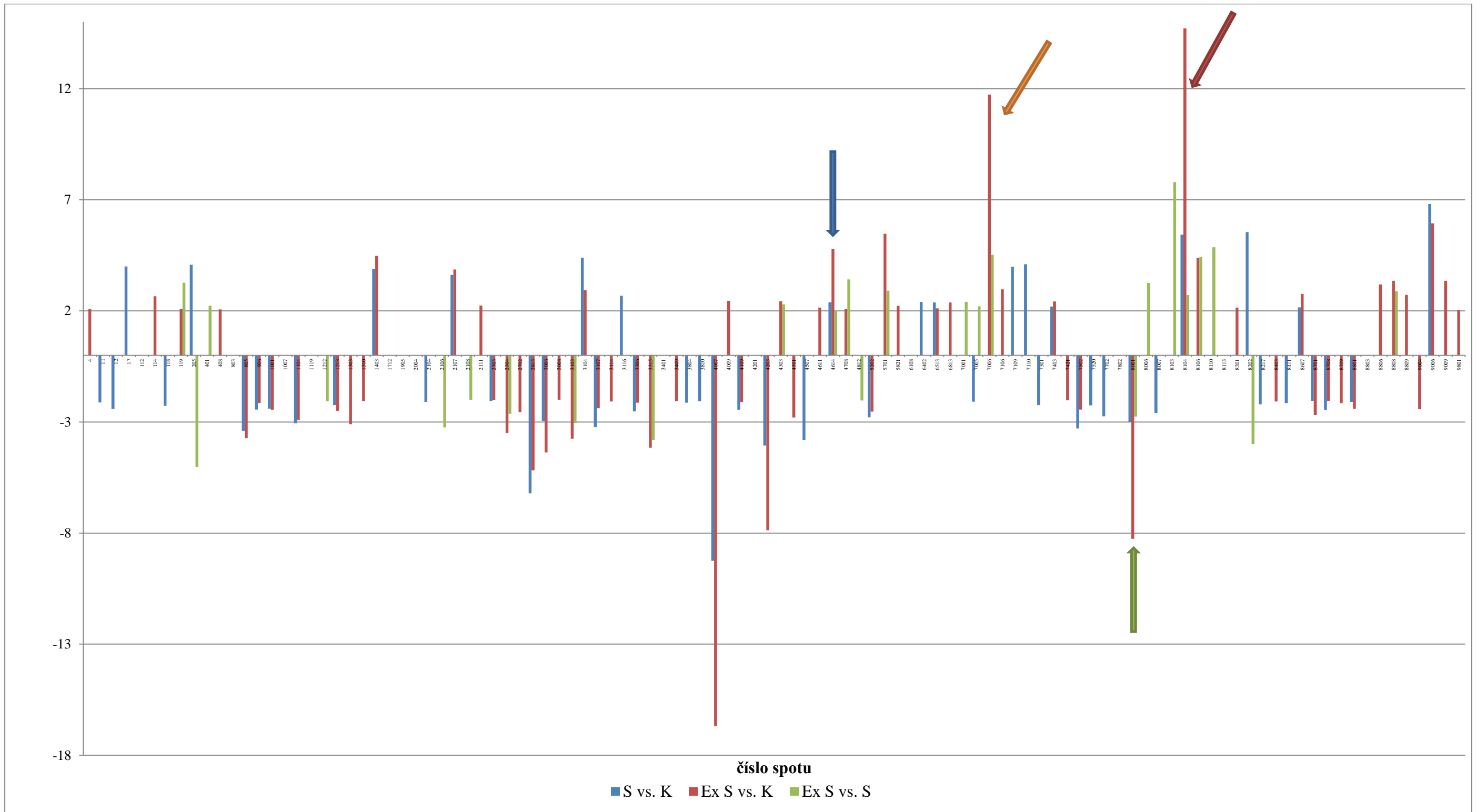
Jako proteomické markery nemusí sloužit jen proteiny, jejichž koncentrace v těle rostliny stoupá, pokud je vystavena stresovým podmínkám. Naopak, může se jednat i o proteiny, jejichž obsah se bude při stresu snižovat. Z funkčních proteinů to mohou být například transmembránové proteiny aquaporiny, jejichž akumulace je při stresu suchem některými autory (Alexandersson *et al.*, 2005) popisována jako snižená. Snižuje se tím tak hydraulická vodivost membrán, což napomáhá uchování vody v buňce. Jako perspektivní se může jevit protein č. 8001 (na obrázku č. 52 označen zelenou šipkou), jehož abundance v suché variantě poklesla 3 krát, v extra suchu pak 8,3 krát a v extra suchu pak jeho koncentrace oproti suchu poklesla 2,8 krát.

Obrázek č. 55: Detail proteinové skvrny 8001 (červeně označeno sucho, zeleně kontrola, oranžově extra sucho)



V době odevzdání této disertační práce nebyly hotovy identifikace vybraných proteinových spotů, z toho důvodu není možné přiřadit k nim jejich funkci a jejich zapojení do biochemicko-fyziologických procesů při stresu suchem.

Obrázek č. 56: Statisticky signifikantní poměry abundance proteinů

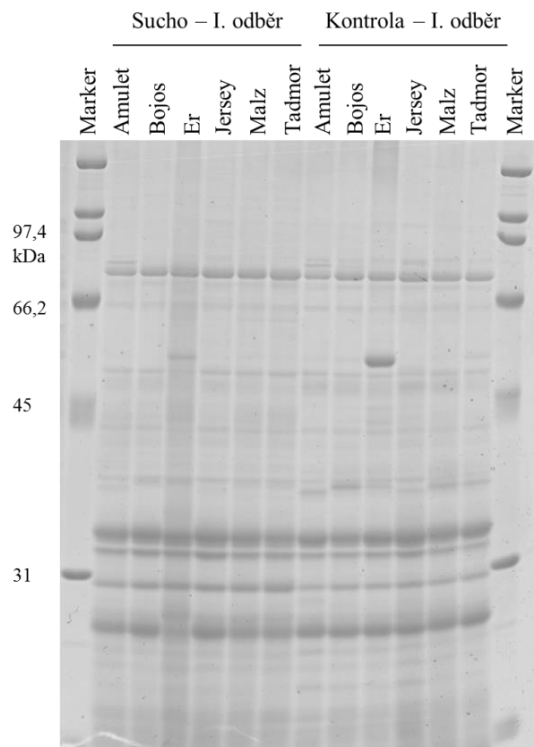


## 5.6 Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha

V rámci tohoto pokusu bylo analyzováno pět odrůd ječmene, a to český Amulet, Bojos a Malz, nizozemský Jersey a syrská krajová odrůda Tadmor. Zásadním rozdílem oproti předešlým pokusům byla jejich organizace a fenologická fáze odběru vzorků. Tento pokus byl koncipován jako venkovní. Pěstební nádoby byly umístěny venku pod přístřeškem, což umožňovalo regulovat závlivku. Diferencovaná závlivka byla aplikována po 28. dnech od výsevu, přičemž kontrolní varianta byla udržována na 75 % PVK a suchá varianta na 30 % PVK. Odběry byly realizovány a) 14 dnů po začátku diferencované závlivky ve fenologické fázi počátek metání a b) 26 dnů po aplikaci diferencované závlivky ve fenologické fázi začátek kvetení.

Neboť nebyla kultivační fáze pokusu realizována ve VÚRV, v.v.i., ale na Mendelově univerzitě v Brně, nebylo získáno dostatečné množství vzorků listů na provedení tří technických opakování dehydrinových analýz, proto nebylo možné provést statistické testování pomocí ANOVA.

Obrázek č. 57: Elektroforetické rozdělení termostabilní frakce proteinů – I. odběr



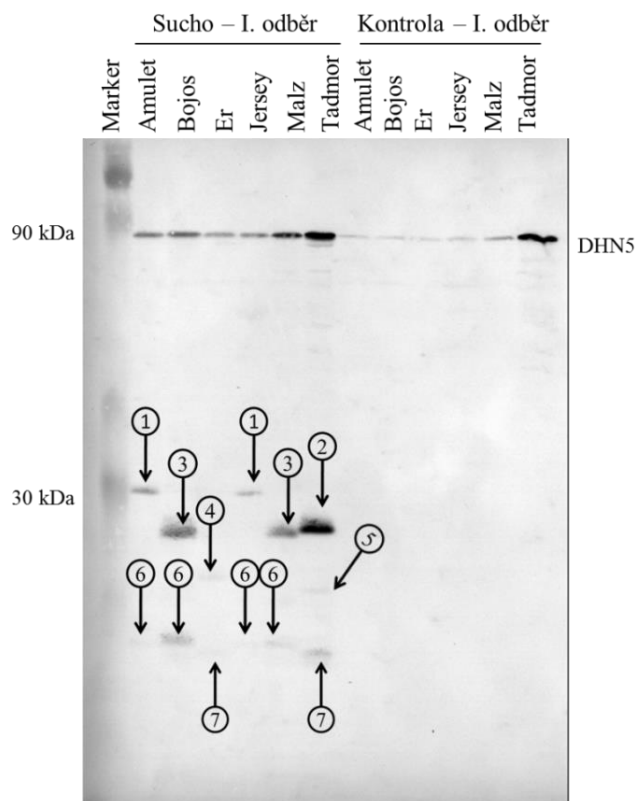
Rozlišení odrůd dle akumulace DHN5 v mnohém potvrdilo předešlé výsledky. Odrůda Tadmor se v oblasti akumulace DHN5 zcela odlišuje od ostatních odrůd, nicméně ani u této



## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

odrůdy nebyly za kontrolních podmínek detekovány jiné typy DHN proteinů s nižšími molekulovými hmotnostmi (obrázek č. 58, tabulka č. 17). Ostatní odrůdy se za kontrolních podmínek od sebe výrazně nelišily. Lze předpokládat, že výraznější množství DHN5 u Malz při 1. odběru může být způsobeno chybou vzorku, neboť v rámci 2. odběru již byly obsahy DHN5 u všech odrůd (vyjma Tadmoru) vyrovnány.

Obrázek č. 58: Imunoblot s vizualizovanými dehydrinovými proteiny – I. odběr



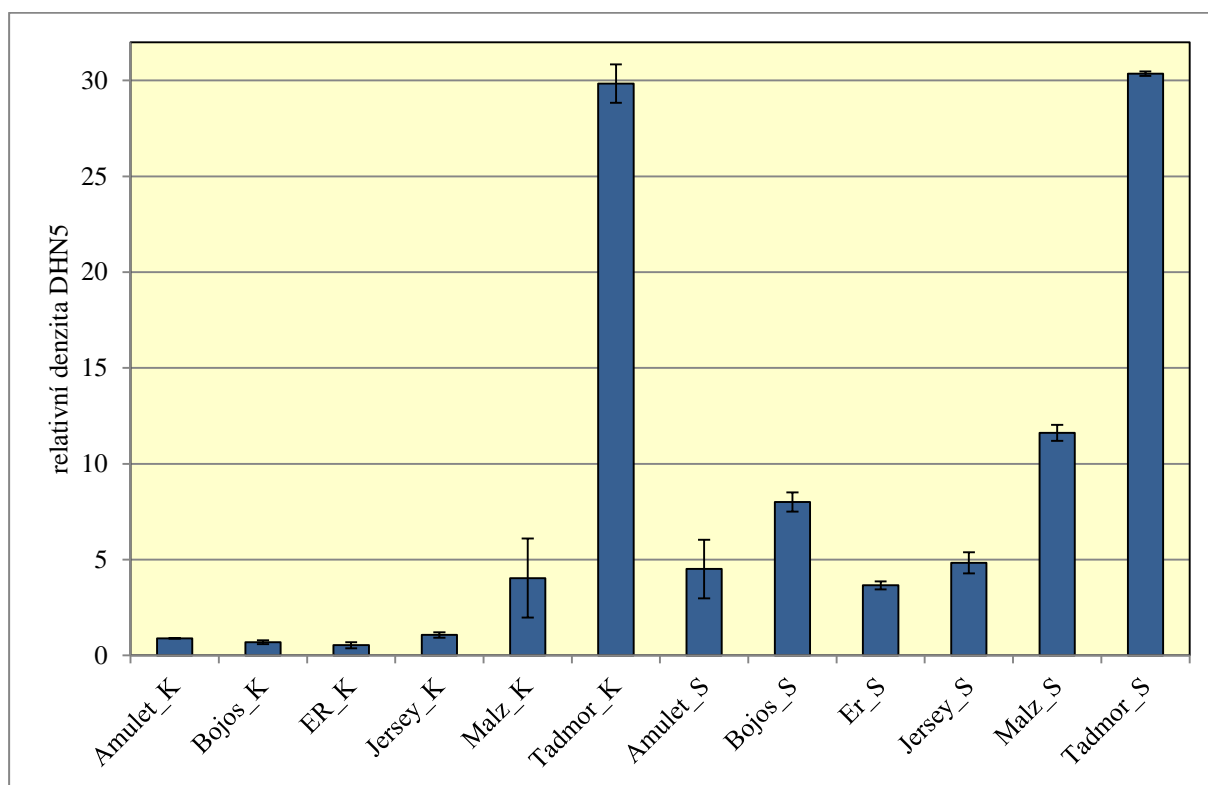
Tabulka č. 17: Tabulkové schéma akumulace DHN proteinů u testovaných odrůd

odrůda	Označení DHN na imunoblotu							DHN5
	1	2	3	4	5	6	7	
Amulet	X					X		X
Bojos			X			X		X
Er				X			X	X
Jersey	X					X		X
Malz			X			X		X
Tadmor		X			X		X	X

Při porovnání výsledků akumulace DHN5 obou odběrů nebyl u jednotlivých odrůd zaznamenán výrazný rozdíl a pokud ano, nebyl statisticky ověřen. Odrůda Er opět vykazovala

nejnižší obsah DHN5, což je v souladu s výsledky předchozích pokusů. Na základě tohoto lze prohlásit, že tato odrůda skutečně nezakládá svou strategii přežití či vyrovnání se se stavy dehydratace na akumulaci DHN proteinů. Za pomoci imunologické analýzy bylo vyjma DHN5 detekováno sedm dalších DHN proteinů, které lze pravděpodobně označit jako různé typy, neboť vykazují různou molekulovou hmotnost. Zajímavým výsledkem však bylo zjištění v oblasti nízkomolekulárních DHN proteinů u odrůdy Er, neboť u ní byl detekován nízkomolekulární typ DHN, který byl detekován také u Tadmoru, přičemž obě tyto odrůdy mají původ v Sýrii. Odrůda Er dále vykazovala akumulaci DHN označeného na imunoblotu číslem 4, přičemž tento typ nebyl detekován u žádné jiné odrůdy.

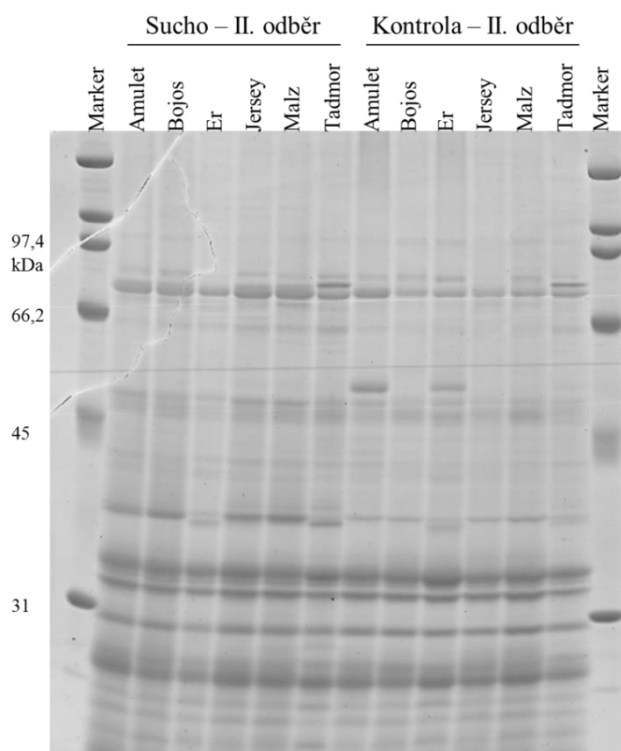
Obrázek č. 59: Graf relativní akumulace DHN5 u souboru ječmenů pěstovaných za odlišných vlhkostních podmínek *I.* odběr



Kvalitativně se nelišil profil exprese DHN proteinů u odrůd Amulet a Jersey, neboť obě tyto odrůdy exprimovaly a akumulovaly velikostně shodné typy dehydrinů. Téměř vyrovnaný byl také obsah DHN5 u těchto odrůd, byť při druhém odběru vykazoval Jersey vyšší akumulaci DHN5. Ovšem protože nebylo provedeno statistické testování pomocí ANOVA, není možné prohlásit to, že odrůda Jersey akumulovala v rámci tohoto odběru vyšší

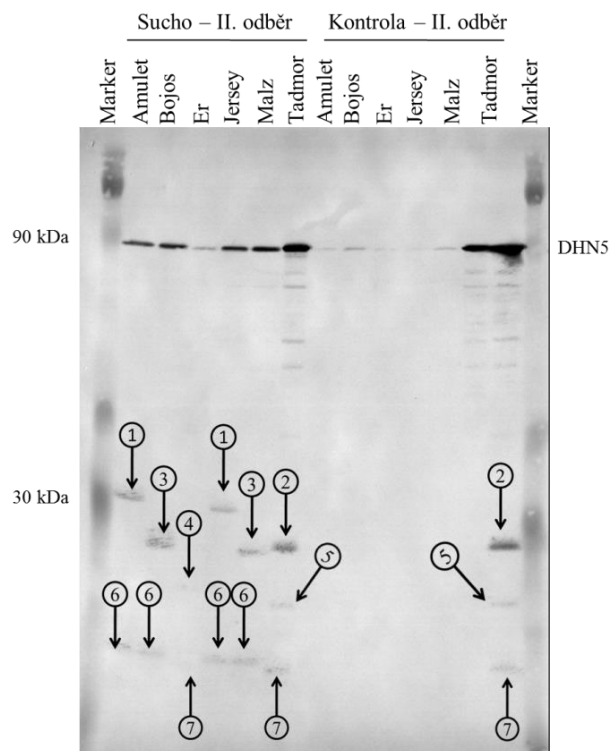
obsah DHN5. V předchozích experimentech v rámci této disertační práce však již bylo statisticky potvrzeno, že odrůda Jersey vykazovala vyšší obsah DHN5, než odrůda Amulet. Odrůda Tadmor vykazovala na imunoblotu slabé bandy viditelné těsně pod DHN5 (obrázek č. 61). Tyto proužky by mohly být považovány za štěpy tohoto vysokomolekulárního DHN, přičemž jsou daleko lépe vizualizovány na imunoblotu druhého odběru. Zajímavé je, že Tadmor v rámci kontrolní varianty nevykazoval při prvním odběru akumulaci nízkomolekulárních DHN proteinů, přičemž při druhém odběru již lze vidět i u kontrolní varianty minimálně tři další typy DHN proteinů (2, 5, 7).

Obrázek č. 60: Elektroforetické rozdělení termostabilní frakce proteinů

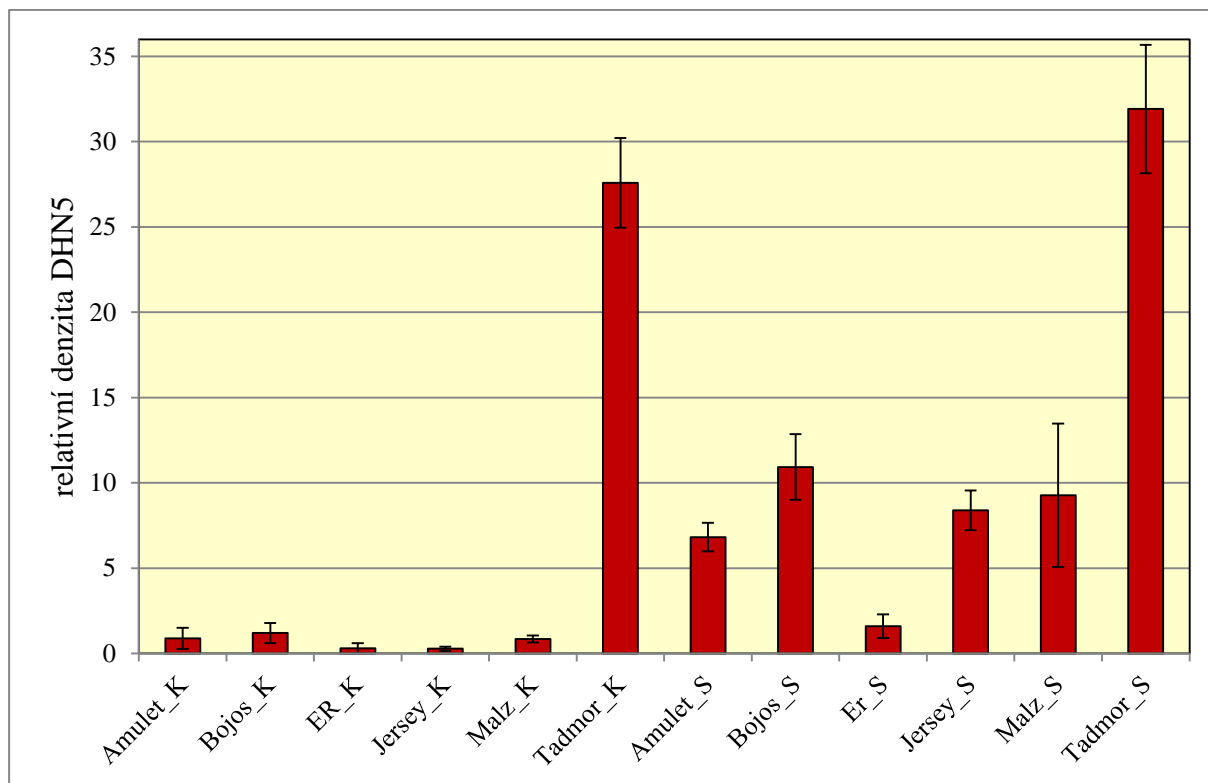


Výsledky akumulace DHN5 odrůdy Malz zcela neodpovídají výsledkům zjištěným v předchozím experimentu, kdy odrůda Malz vykazovala v porovnání s odrůdou Amulet statisticky signifikantně nižší obsah DHN5 (obrázek č. 62). Pokud jsou však srovnány tyto dosažené výsledky s pokusem, ve kterém se rovněž testovala odrůda Malz, ovšem v jiné fenologické fázi (3. pravý list) při náhlém vysychání, je možno říci, že výsledky tohoto pokusu tendenčně odpovídaly zjištěním plynoucích z analýz tohoto pokusu, kdy byly testovány rostliny ve fenologické fázi metání až začátek kvetení.

Obrázek č. 61: Imunoblot s vizualizovanými dehydrinovými proteiny – II. odběr



Obrázek č. 62: Graf relativní akumulace DHN5 u souboru ječmenů pěstovaných za odlišných vlhkostních podmínek II. odběr



## 6 DISKUSE VÝSLEDKŮ

Cílem experimentů v rámci této disertační práce bylo potvrdit hypotézu, že různé odrůdy ječmene vykazují rozdílnou odolnost vůči suchu (jsou tedy odlišně suchovzdorné) a že lze tyto odrůdy od sebe odlišit pomocí stanovení obsahu dehydrinů. Dalším předpokladem bylo, že určité charakteristiky aktuálního i dlouhodobějšího fyziologického stavu rostlin (VSD,  $\Delta^{13}\text{C}$  a OP) lze využít jako indikátory, které mohou pomoci dokreslit složité vztahy mezi vlastnostmi odrůd, které souvisejí s vodním režimem rostlin.

Dalším cílem kromě aplikace již publikovaných markerů (dehydrinů) bylo vytipovat další potenciálně využitelné proteomické markery, které by mohly být aplikovány v běžné šlechtitelské praxi.

Z výsledků použití různých extrakčních postupů pro získání proteinové frakce využitelné v dehydrinových analýzách, bylo dospěno k závěru, že varem, který je používán v postupu podle Vítámvás *et al.* (2007), lze dosáhnout jiného elektroforetického profilu, než u postupu podle Sun *et al.* (2008) nebo jeho modifikace. Silný band na elektroforeogramu o velikosti mezi 45 kDa a 66 kDa, který je nejabundantnějším bandem výsledku extrakce dle Sun *et al.* (2008), na elektroforeogramu u extrakce dle Vítámvás *et al.* (2007) téměř chybí. Lze to vysvětlit tím, že proteiny této frakce jsou termolabilní a byly varem vysráženy. Dle dostupné literatury by se mohlo jednat o subjednotky ribuloza-1,5bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (Rubisco), který je složen z 16 proteinových subjednotek – 8 kopií malých podjednotek (SSU) a 8 kopií velkých podjednotek (LSU) (Raikhel *et al.*, 2000). Výsledky vizualizace dehydrinových proteinů za pomoci imunologické metody navázání primární protilátky na antigenní determinantu dehydrinových proteinů, tzv. K segment nacházející se blízko C terminálního konce, jsou patrné z imunoblotu na obrázku č. 11. K segment je jedinou vždy přítomnou konzervovanou doménou, skládající se z 15. aminokyselinových zbytků a v dehydrinech se vyskytuje od 1 do 11 kopií (Choi *et al.*, 1999), na kterou se vážou polyklonální protilátky využívané při detekci dehydrinů (Close *et al.*, 1993). Na imunoblotu je patrné, že dehydrinové proteiny byly detekovány jen u vzorků suché varianty, které byly extrahovány dle metody Vítámvás *et al.* (2007).

Z výsledků tohoto experimentu, který měl posoudit dvě různé metody extrakce dehydrinových proteinů vč. jedné modifikace, bylo dojito k jednoznačnému závěru, že nebyly potvrzeny výsledky extrakce dehydrinové frakce popisované Sun *et al.* (2008) a z tohoto důvodu bylo přistoupeno k aplikaci metody extrakce dehydrinových proteinů podle Vítámvás *et al.* (2007). Tuto metodu extrakce lze charakterizovat jako velmi hodnověrnou, byť oproti metodě dle Sun *et al.* (2008) jako pracnější.

## 6.1 Vývoj a evaluace metody pěstování rostlin ječmene pro následné experimenty

Rostliny ječmene odrůdy Amulet byly pěstovány za třech odlišných vlhkostních podmínek substrátu – 35 % PVK a 40 % PVK (suché varianty) a 65 % PVK (kontrolní varianta) (tabulka č. 5).

V případě stresu suchem byly za pomoci imunoblotu detekovány nejméně dva typy DHN proteinů. Pro následné denzitometrické analýzy bylo dále přistoupeno k hodnocení abundantního proteinu DHN5, přičemž lokalizaci jeho genu Close *et al.* (1995) popisuje na chromozómu 6H. U extra suché varianty byla detekována mírně zvýšená hladina DHN5, přičemž hladina tohoto dehydrinu byla u suché a kontrolní varianty na hranici denzitometrické detekovatelnosti (statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a extra suchou variantou v obsahu DHN5). U extra suché varianty byl dále detekován nízkomolekulární DHN (cca 30 kDa), a to ve významně vyšším množství, než u suché a kontrolní varianty, u nichž lze o detekci tohoto DHN pochybovat.

Závěry z výsledků fyziologických charakteristik jsou takové, že za pomoci VSD bylo možno statisticky signifikantně rozlišit všechny tři varianty, stejně tak byly varianty odlišeny za pomoci změření hodnot osmotického potenciálu. Tímto zjištěním byla potvrzena negativní korelace mezi obsahem vody v těle rostliny, který je vyjádřen charakteristikou VSD a koncentrací tzv. osmoprotektivních látek, vyjádřené jako OP. Tyto výsledky korespondují s výsledky práce Chen *et Murata* (2002), neboť čím je vyšší ztráta vody z buněk, tím více jsou akumulovány molekuly kompatibilních solutů, což je zapříčiněno jednak aktivací jejich biosyntézy a naopak inaktivací jejich degradace.

Měření charakteristiky diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  poskytlo výsledky toho typu, že bylo možno statisticky významně odlišit extra suchou/suchou variantu od varianty kontrolní. Rostliny ječmene stresovaných variant daleko méně diskriminovaly izotop  $^{13}\text{C}$  a tedy lépe využívaly dostupnou vodu a zabudovávaly do organických sloučenin více atomů uhlíku na jednotku spotřebované vody, což je v souladu s výsledky práce Farquhar *et al.* (1989). Parametr  $\Delta^{13}\text{C}$  stoupal pozitivně s množstvím dostupné vody, které měly rostliny k dispozici pro svůj růst a vývoj, tento výsledek je konzistentní s výsledky, které publikoval Chen *et al.* (2011).

Po prvním odběru následovalo vyrovnání obsahu půdní vlhkosti na 50 % PVK a substrát s rostlinami 6 dní vysychal (tabulka č. 6).

Denzitometrickou analýzou akumulace DHN bylo zjištěno, že došlo po 6. denním vysychání k prudkému nárůstu exprese DHN5 u kontrolní varianty, což je s nejvyšší pravděpodobností spjato s nástupem obranné reakce neaklimatizované rostliny na stres suchem (Škodáček *et* Prášil, 2011). Zajímavé bylo zjištění relativní denzity nízkomolekulárních DHN. Zatímco obsah tohoto DHN o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa u varianty extra sucha statisticky signifikantně poklesl, u suché a kontrolní varianty abundance tohoto DHN prudce vzrostla.

Při 2. odběru vzorků byl obsah vody v substrátu pěstovaných rostlin jednotlivých variant téměř shodný (30 % PVK). Tento fakt se však neodrážel v obsahu vody v rostlinných tělech, který byl vyjádřen pomocí VSD. Neaklimatizované rostliny kontrolní varianty s dlouhými čepelemi listů a vysokým počtem stomat na jednotku plochy vykazovaly při vysychání vysoký VSD (53 %), zatímco aklimatizované rostliny extra suché a suché varianty nevykazovaly zvýšené VSD oproti 1. odběru, naopak rostliny suché varianty vykazovaly nižší VSD. Menší listová plocha transpiruje méně vody a v půdě se uchovává zásoba vody na delší období. Průběh charakteristiky OP byl velmi podobný, jako u VSD a bylo možno statisticky signifikantně odlišit extra suchou/suchou a kontrolní variantu. Konzistentně s výše uvedenými fakty reagovaly rostliny i v oblasti efektivity využití vody. Hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$  rostlin aklimatizovaných variant byly téměř shodné, ovšem diskriminace  $^{13}\text{C}$  neaklimatizovaných rostlin signifikantně poklesla, neboť rostliny musely začít efektivně využívat vodu, což je v souladu s výsledky práce Chen *et al.* (2011). V této práci autoři testovali 4 genotypy ječmene (CDC Cowboy, Niobe, 170011 a Kasota), vykazující různou úroveň diskriminace  $^{13}\text{C}$ . Rostliny byly pěstovány ve skleníku v dobře vodou saturovaném substrátu a za sucha, s cílem potvrdit genotypickou variabilitu parametru  $\Delta^{13}\text{C}$ . Rostliny ječmene byly zatíženy suchem po 10 dnů ve stádiu sloupkování. Autoři potvrdili, že za sucha rostliny diskriminovaly  $^{13}\text{C}$  méně, než v kontrolních podmínkách, přičemž některé genotypy za stresových podmínek využívaly dostupné vody lépe, než jiné.

Výsledky faktorové analýzy přinesly zjištění toho druhu, že proměnné VSD, OP a DHN tvořily jednu skupinu proměnných, tj. vykazovaly vysoké hodnoty faktorové zátěže k faktoru č. 1. Tyto proměnné jsou tedy navzájem úměrné, přičemž OP je nepřímou úměrnou k VSD a DHN. Naopak proměnné DHN a VSD vykazují vzájemnou přímou korelaci.

Při převodu jednotlivých pozorování do faktorového prostoru byly vytvořeny shluky a to těmi případy, které se chovaly podobně.

## **6.2 Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – I. odběr**

Rostliny ječmene odrůd Er, Jersey, Malz, Tolar, Amulet, Tadmor a Akcent byly testovány za dvou odlišných obsahů vlhkosti substrátu – suchá varianta 30 % PVK a kontrolní varianta 65 % PVK.

Rostliny se oproti předešlému experimentu nacházely při 1. odběru ve fenologické fázi 2. pravého listu a doba jejich kultivace byla také zkrácena (tabulka č. 8). Lze předpokládat, že tyto faktory mohly ovlivnit výsledky analýz oproti předešlému pokusu.

Z hlediska translace mRNA *Dhn* genů a následné akumulace DHN proteinů, bylo na základě imunologické analýzy zjištěno, že se odrůdy v obsahu DHN5 nelišily, a to dokonce ani kontrolní a suchá varianta mezi sebou. Výjimku tvořily odrůdy Tolar a Tadmor, které vykazovaly vysoký stupeň akumulace DHN5. Na základě tohoto je možné předpokládat, že strategií těchto dvou odrůd, jakým způsobem se vyrovnávají s nedostatkem vody, je silná exprese a akumulace dehydrinových proteinů. Co se týče kvalitativních rozdílů v expresi *Dhn* genů, nebyla v tomto experimentu zjištěna přítomnost jiných (nízkomolekulárních) dehydrinů, než DHN5. Lze se domnívat, že toto je skutečně způsobeno fenologickou fází, ve které se rostliny nacházely v době odběru. Lze tedy hovořit o jisté vývojové specifitě exprese *Dhn* genů, což je v souladu s prací Guo *et al.* (2009).

Z hlediska doprovodných fyziologických charakteristik bylo možno rozlišit statisticky signifikantně některé odrůdy suché varianty mezi sebou.

Například odrůda Er, která pochází z původních syrských krajových odrůd a je citlivá vůči suchu, vykazovala vysoký stupeň vodního deficitu, což bylo také vždy spojeno se silnou syntézou osmoticky aktivních látek, tedy s nižším osmotickým potenciálem. Toto zjištění je v souladu s výsledky prací Nevo *et Chen* (2010).

Odrůda Amulet vykazovala v rámci fyziologických charakteristik průměrné hodnoty. Výjimku tvořily hodnoty diskriminace  $^{13}\text{C}$ , které byly tendenčně nejnižší, a je možné tedy říci, že tato odrůda za podmínek sucha hospodaří s vodou efektivněji, než ostatní testované odrůdy. Opačný trend vykazovala odrůda Tadmor, která v oblasti efektivity využití vody vykazovala ve srovnání s ostatními odrůdami nepříliš dobré využití vody vzhledem k vytvořené sušině.



### **6.3 Testování suchovzdornosti sedmi různých odrůd ječmene pěstovaných za dvou odlišných stupňů nasycení vodou a náhlého vysychání – II. odběr**

V druhé fázi tohoto experimentu byl vyrovnán obsah půdní vlhkosti u obou variant na 48 % PVK a nádoby s rostlinami byly po 7 dnů ponechány vysychat (tabulka č. 9).

V oblasti akumulace DHN proteinů byly zaznamenány značné odlišnosti od výsledků 1. části pokusu. Ve srovnání s 1. částí pokusu byl zaregistrován kvantitativní nárůst DHN5, a to jak u neaklimatizovaných (kontrolních), tak i u aklimatizovaných (stresovaných) odrůd. Nejvyšší akumulaci DHN5 opět vykazovala odrůda Tadmor, která je silně adaptována na sucho. Je tedy možné říci, že při náhlém vysychání reaguje většina odrůd nastartováním transkripce a následné translace *Dhn* genů, což konsekvenčně vyvrcholí v akumulaci DHN proteinů, resp. DHN5, toto zjištění je v souladu s pracemi Hong-Bo *et al.* (2005) nebo Park *et al.* (2006). Ovšem ani při tomto pokusu nebyly zaznamenány jiné DHN proteiny, než DHN5.

Při porovnání VSD rostlin 1. odběru stresované varianty a 2. odběru kontrolní varianty lze vyzorovat stejné tendenční rozložení odrůd z hlediska této fyziologické charakteristiky. Toto zjištění lze interpretovat tak, že každá odrůda testovaných ječmenů udržuje obsah vody ve svém těle za totožných vlhkostních a teplotních podmínek na jiné úrovni, toto zjištění je ve shodě se Suprunova *et al.* (2004).

Zajímavé jsou výsledky odrůdy Er. Tato odrůda reaguje na sucho expresí enzymů, které působí v anabolických cestách, jejichž výsledkem je vysoký obsah nízkomolekulárních kompatibilních solutů. Thomassini *et al.* (2008) ve své práci uvádí, že rostliny ječmene, které byly zatíženy suchem nebo chladem, indukovaly syntézu transkriptů genů, které kódují proteiny spojené s mechanismem ochrany membrán a akumulací osmoprotektantů – sacharosy, rafinosy, glycin betainu, galaktinolu a prolinu. V případě sucha byly aktivovány geny sacharosa-fosfát syntasy IF, sacharosa syntasy 2, ATP-vázající galaktokinasy a betainaldehyd dehydrogenasy. Při stresu nízkou teplotou nebo při suchu byla zvýšena transkripce galaktinol syntasy,  $\Delta$ 1-pyrrolin-5-karboxylát oxygenasa. Jak již bylo zmíněno, molekuly osmoprotektantů se akumulují v cytoplasmě ve vysokých koncentracích za osmotického stresu a uplatňují se při udržování turgoru, stabilizaci proteinů a buněčných struktur a detoxikaci reaktivních forem kyslíku (Chen *et Murata*, 2002).

I metoda náhlého vysychání potvrdila strategii Tolaru, kterou se tato odrůda vyrovnává se stavy dehydratace. Tato odrůda primárně staví strategii přežití při stresových podmínkách primárně na silné akumulaci DHN proteinů. Kosová *et al.* (2010) uvádí, že tyto proteiny jsou osmoticky aktivní, a tím tedy snižují OP buněčné šťávy.

Rostliny odrůdy Tadmor, a to jak aklimatizované, tak i neaklimatizované na sucho, vykazovaly v podmínkách náhlého vysychání statisticky nevýznamné rozdíly. Velmi podobně reagovaly i odrůdy Jersey a Malz. Z toho lze usuzovat, že tyto odrůdy i v podmínkách náhlého vysychání disponují mechanismy, které zamezují náhlé ztrátě vody z pletiv rostliny. Odrůdy Amulet a Akcent dle výsledků měřených fyziologických parametrů mají pravděpodobně velmi podobnou schopnost regulace výdeje vody, i když odrůda Akcent tendenčně vykazovala nižší VSD. V oblasti efektivity využití vody vykazovaly tyto dvě odrůdy opět nevýznamné rozdíly, byť tendenčně opět vykazovaly nižší diskriminaci  $^{13}\text{C}$  rostliny Akcentu. V oblasti akumulace DHN5 se však tyto dvě odrůdy při náhlém vysychání lišily, a to u neaklimatizovaných odrůd. Rostliny Akcentu ve srovnání s Amuletem vykazovaly vysoký nárůst DHN5, proto lze prohlásit, že odrůda Akcent reaguje v podmínkách náhlého vysychání silnou expresí DHN5.

### **6.4 Testování suchovzdornosti – metoda náhlého vysychání**

Neaklimatizované rostliny odrůdy Amulet byly v rámci tohoto experimentu vystaveny náhlému vysychání substrátu (tabulka č. 7).

Obsah DHN5 v pletivech listů rostlin stoupal v souvislosti s počtem dnů od ukončení zálivky. Dramatický nárůst obsahu DHN5 byl zaznamenán 8. den po ukončení zálivky, kdy VSD dosáhlo 32 %. Z tohoto faktu lze usuzovat, že výraznější proteosyntéza DHN5 začíná ve chvíli, kdy obsah vody v rostlině poklesne pod 70 %. V rámci tohoto odběru byl také zaznamenán významný pokles v diskriminaci  $^{13}\text{C}$ , což značí, že v tomto stádiu již začaly rostliny efektivněji využívat dostupnou vodu. V rámci následujícího odběru, tedy 12 dnů od začátku pokusu, se zvýšil obsah DHN5 2,7 krát oproti předešlému odběru, přičemž hodnoty VSD dosahovaly hodnot 63 %, což lze považovat z fyziologického hlediska již za letální hodnoty (Procházka *et al.*, 1998) (odborná literatura uvádí různé letální hodnoty VSD, někdy už od 40 %, záleží na rostlinném druhu). Rostliny v této fázi vizuálně vykazovaly vysoký stupeň nedostatku vody a byly proto slabě turgescentní, nicméně žádná nebyla rozpoznána jako uhynulá.

Po zavlažení rostlin a vyrovnání půdní vlhkosti na 40 %, která byla udržována po 3 dny, nedošlo k významnému poklesu obsahu DHN5, přičemž VSD pokleslo na 36 %. Z tohoto je možno usuzovat, že odbourávání DHN bílkovin není odstartováno ihned poté, co dojde ke zvýšení obsahu vody v pletivech rostlin, a to dokonce ani po několika dnech. Toto je v souladu s rolí DHN proteinů v aklimatizačních procesech rostlin (Kosová *et al.*, 2007). Tyto procesy jsou samozřejmě komplexního charakteru a nelze předpokládat, že po odeznění

stresoru bude okamžitě zahájena degradace DHN proteinů. Z hlediska diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  byly u zavlažených rostlin detekovány nejnižší hodnoty  $\Delta^{13}\text{C}$ . Lze se domnívat, že v aklimatizačním procesu, který byl odstartován postupným snižováním obsahu vody v substrátu, pokračovaly rostliny i za vlhkostních podmínek, které lze označit jako relativně vhodně. Tento fakt je v souladu s výše uvedenou nerozdílnou hladinou DHN5 za vysokého stresu i za stavu relativní stabilizace vodního režimu rostliny.

### **6.5 Testování suchovzdornosti čtyř odrůd ječmene ve fázi 4. pravého listu**

V tomto experimentu byly analyzovány odrůdy ječmene Amulet, Akcent, Malz a syrská krajová odrůda Tadmor, přičemž rostliny byly kultivovány v kontrolních podmínkách (64 % PVK), v suchu (34 % PVK) a dále odrůda Amulet ještě za extra sucha (30 % PVK) (tabulka č. 10).

Rozdílem oproti předešlým pokusům bylo to, že při počátku pokusu, tj. při aplikaci diferencované závlivky a dále pak při odběru vzorků se rostliny nacházely ve vývojově pokročilejší fenofázi.

Výsledky dehydrinových analýz ukázaly, že v rámci kontrolní varianty se akumulací DHN5 odlišovala jen odrůda Tadmor. Suchem zatížené rostliny jednotlivých odrůd se však chovaly v oblasti akumulace DHN5 navzájem odlišně a proto bylo možno od sebe odlišit zkoušené odrůdy dle obsahu DHN5 v jejich listových pletivech. Dále byly imunologickou metodou detekovány nízkomolekulární DHN proteiny, a to nejméně pět s různou molekulovou hmotností.

V oblasti VSD byly všechny odrůdy v rámci stresované varianty nerozdílné, vyjma Tadmoru, který dosahoval hodnot kolem 32 %, přičemž ostatní vykazovaly VSD kolem 40 % (Amulet ve variantě extra sucha dosáhl VSD 53,5 %). Odrůda Amulet se v porovnání obou stresovaných variant nelišila v oblasti akumulace DHN5, avšak vykazovala signifikantní rozdíl v OP.

Proteomické analýzy realizované v rámci tohoto pokusu na Amuletu a následné obrazové a statistické analýzy odhalily 106 diferenciálně akumulovaných proteinů. Shluková analýza tyto proteiny dle hladiny jejich obsahu v jednotlivých variantách rozdělila do 4 shluků. Obecně, obsah proteinů spadajících do 1. a 3. shluku se za sucha zvyšoval, naopak akumulace proteinů ve shlucích 2 a 4 při suchu klesala.

Shluk č. 1 (25 proteinů) obsahuje proteiny, jejichž koncentrace stoupala od kontrolní varianty přes suchou až po extra suchou. Práce Bogeat-Triboulot *et al.* (2007) popisuje změny proteomu topolu *Populus euphratica* vystaveného suchu, přičemž byly zaznamenány zvýšené

kumulace proteinů působících v metabolismu uhlíku a fotosyntetických drahách, jako například  $\alpha$  a  $\beta$  jednotka ATP syntasy, Rubisco aktivasa, podjednotky komplexu vyvíjejícího kyslík (OEC) a proteinů zapojených v glykolýze jako GADPH (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa) a PGK (fosfoglycerátkinasa). Zhu *et al.*, (2007) uvádí, že redukováný příjem vody kořeny má negativní vliv na prodlužovací růst buněk, který je založený na elongaci buněčné stěny buněk. Autoři této práce studovali změnu proteomu u kořenů rostlin kukuřice, která byla zatížena suchem. Práce přinesla zjištění o zvýšené akumulaci apoplastických enzymů zhášejících ROS (aktivní formy kyslíku), hlavně pak peroxidas. Zdá se, že tyto proteiny přispívají k vyššímu rozvolňování buněčné stěny při stresu dehydratací. Jiné proteiny buněčné stěny, které vykazovaly zvýšenou abundanci, patřily do skupiny inhibitorů polygalakturonas, chitinas, osmotinu a prekurzoru nodulinu. Autoři také zjistili zvýšenou abundanci  $\beta$ -D-glukosidas, přičemž tyto enzymy participují při odštěpení ABA z jejich sacharidových konjugátů, což je předpoklad pro aktivní ABA formu.

Koncentrace proteinů v rámci shluku č. 2 (44 proteinů) a 4 (8 proteinů) měla snižující se trend směrem od kontrolní varianty po extra suchou variantu. Práce Zhu *et al.* (2007), která zkoumala vliv sucha na proteom kořenů kukuřice prokázala, že při suchu došlo ke snížení abundance některých hydrolas v buněčné stěně, což indikuje snížení elongační aktivity buněčné stěny během sucha. Kosová *et al.* (2011b) uvádí, že mezi proteiny, jejichž akumulace je při stresu suchem snížena, spadají také proteiny zapojené do signálních drah (protein homeobox-leucinového zipu, AP2/EREB transkripční faktor BABY BOOM). Lehman *et al.* (1995) uvádí, že v rostlinách ječmene byla za sucha snížena akumulace 23 kDa jasmonátem indukovaného proteinu (JIP-23), který zřejmě reguluje syntézu polysacharidů buněčné stěny. Alexandersson *et al.* (2005) ve své práci prokázal u rostlin *Arabidopsis*, které byly vystaveny stresu suchem, snížené množství PIP proteinů (plasma membrane intrinsic protein) v listech. PIP jsou typy aquaporinů, které usnadňují a regulují transport molekul vody přes membrány.

Koncentrace proteinů v rámci shluku č. 3 má poněkud nestandardní průběh, přičemž některé z nich dosahují svého maxima ve variantě sucho a ve variantě extra sucho dochází poté k mírnému poklesu. To znamená, že s postupujícím suchem již nedochází ke zvyšování koncentrace těchto proteinů.

Rozdělení diferenčně se exprimujících (akumulujících) proteinových spotů za pomoci shlukovací analýzy do čtyř klastrů je ve shodě s prací Vítámvás *et al.* (2012). Tato práce se sice zabývá analýzou proteomu odrůd zimní pšenice během chladové aklimatizace, nicméně na základě práce Kosová *et al.* (2011b) lze generalizovat dynamiku odpovědi rostliny na abiotické stresy. Každá fáze odpovědi rostliny na abiotické faktory koresponduje s rozdílným

složením proteomu. Iniciační fáze (alarm stage), kterou lze označit jako poplachovou či šokovou fází, je asociována s indukcí signálních drah stresové odpovědi rostliny a silným oxidativním stresem. Následná fáze aklimatizace (acclimation phase) se vyznačuje *de novo* biosyntézou protektivních látek (proteiny jako chaperony nebo COR/LEA, antioxidanty jako karotenoidy, tokoferoly a dále osmoprotektanty jako prolin), následuje fáze udržovací (maintenance phase), při které je udržována nově ustavená homeostáze (míra tolerance rostliny během této fáze zůstává stabilní). Další stupeň je fáze vyčerpání, která nastává tehdy, trvá-li stres příliš dlouho a rostlina není schopna nově nastolenou homeostázi dál udržet (během této fáze tolerance rostliny klesá). Poté, co pomine působení stresu, nastává fáze obnovení (recovery phase), při které dochází k degradaci protektivních složek a je ustavena nová buněčná rovnováha.

Poměry abundance proteinů mezi jednotlivými variantami (sucho/kontrola, extra sucho/kontrola a extra sucho/sucho), jejichž statistická signifikance byla ověřována t-testem, ukázala zajímavé proteinové spoty, jejichž akumulace rostla s intenzitou stresu, kterému byly rostliny vystaveny. Tyto proteiny by mohly v budoucnu sloužit jako potenciálně využitelné markery suchovzdornosti. Je samozřejmě nezbytné je nejprve identifikovat, čímž bude odhalena také jejich funkce a na základě tohoto by mohly být využity pro testování na širším spektru genotypů za pomoci kvantitativních metod (Western blot atd.).

### **6.6 Nádobové pokusy simulující stav dlouhodobého sucha**

V rámci tohoto experimentu byly analyzovány rostliny odrůd ječmene Amulet, Bojos Malz, Jersey a Tadmor. Rozdílem oproti předchozím pokusům bylo to, že rostliny byly pěstovány venku, byť za kontrolované zálivky. Dalším zásadním rozdílem byla fenologická fáze rostlin, ve které se nacházely v době odběru vzorků (tabulka č. 11).

Výsledky tohoto pokusu potvrdily předešlé výsledky, např. v oblasti vysoké akumulace dehydrinových proteinů u odrůdy Tadmor, nebo naopak nízké akumulace DHN5 u odrůdy Er. Vyjma DHN5 byly na imunoblotu detekovány také různé typy nízkomolekulárních dehydrinových proteinů.

## 7 ZÁVĚR

- Množství akumulovaného DHN5 v rostlině ječmene pravděpodobně závisí na fenologické fázi, ve které se rostlina právě nachází, tj. tento fakt lze označit jako kvantitativně vývojovou specifickou exprese a akumulace DHN5.
- Expresse nízkomolekulárních *Dhn* genů je pravděpodobně vývojově specifická, neboť v ranějších fenofázích (1. – 3. pravý list) nebyly nízkomolekulární DHN proteiny detekovány, či byly na hranici denzitometrické detekovatelnosti.
- Nízkomolekulární DHN bílkoviny o různé molekulové hmotnosti byly detekovány ve vysoké míře u starších rostlin ječmene (od 3. – 4. pravého listu).
- Mohutnější exprese a akumulace DHN5 je u rostlin ječmene zřejmě inicializována, poklesne-li obsah vody v pletivech listů rostliny pod 60 %.
- Míru akumulace DHN5 ovlivňuje to, zda je rostlina na sucho aklimatizována (prošla fází aklimatizace) či je vystavena náhlému vysychání:
  - Amulet při dlouhodobějším suchu zřejmě syntetizuje vyšší množství DHN5 než Akcent, který ovšem zřejmě akumuluje DHN5 ve stavu náhlého vysychání ve vyšší míře.
- Při náhlém vysychání jsou v nižší míře uplatněna anatomicko-morfologická přizpůsobení rostlin pro stabilizaci jejího vodního stavu, kterými rostlina reaguje při aklimatizaci na sucho (snížený počet stomat na jednotku plochy listu, menší plocha listu, rozvinutější kořenový systém, atd.).
- Při náhlém vysychání každá odrůda rozdílně mobilizuje své obranné mechanismy, přičemž některé upřednostňuje.
- Různé odrůdy mohou mít různé strategie, jak se vyrovnat se suchem:
  - Odrůda Er vždy tendenčně vykazovala vyšší stupeň vodního deficitu, ve spojení s mohutnou syntézou nízkomolekulárních osmoprotektantů a nízkou akumulací DHN5,
  - Tadmor naopak při stresu suchem vždy vykazoval tendenčně vysoký obsah vody v pletivech (nízký VSD), vysoký obsah DHN a nízký obsah nízkomolekulárních kompatibilních solutů. To je v souladu s geografickou oblastí jeho pěstování, neboť tato linie byla vyselektována z původních syrských krajových odrůd *Hordeum vulgare* L. Nevýhodou je, že tato odrůda není pro zemědělce v České republice prakticky (komerčně) využitelná, a to z důvodu nízkých výnosů a kvality zrna.

- Pomocí faktorové analýzy bylo možné rozdělit testované odrůdy ve faktorovém prostoru díky jejich faktorovým skóre, což umožňuje komplexně zhodnotit reakci dané odrůdy na stresový faktor ve srovnání s odrůdami jinými.
- Za pomoci metody 2-D DIGE bylo zjištěno cca 900 diferenciálně exprimovaných proteinů u rostlin jarního ječmene odrůdy Amulet, které byly zatíženy dvěma definovanými úrovněmi sucha.
- Kvantitativní analýza odhalila z těchto 900 proteinů 106 diferenciálně akumulovaných proteinů, jejichž abundance se lišila nejméně dvakrát mezi srovnávanými variantami.
- Shlukovací analýza rozdělila dle vzdálenosti těchto 106 proteinů do čtyř shluků:
  - První shluk zahrnuje proteiny, jejichž akumulace stoupala od kontrolní varianty přes variantu suchou a svého maxima dosahovaly u extra suché varianty,
  - Druhý shluk obsahuje proteiny, jejichž akumulací maximum bylo dosaženo v kontrolní variantě a pokles byl zaznamenán ve variantách stresovaných,
  - Třetí shluk obsahuje proteiny, jejichž dynamika může být z fyziologického pohledu zajímavá, neboť svého akumulacího maxima dosahují ve variantě sucho a ve variantě extra sucha jejich abundance klesá,
  - Shluk čtyři zahrnuje nejmenší počet proteinů. Akumulace těchto proteinů směrem ke stresovaným variantám klesá, nicméně vykazují mnohem vyšší akumulaci, než proteiny zařazené ve shluku dvě.
- Na základě detailnějších analýz poměrů abundancí proteinů u jednotlivých variant a jejich testování pomocí t-testu byly vytipovány proteiny, které by mohly sloužit jako proteomické markery:
  - Jedná se o proteiny, jejichž koncentrace se obecně za sucha zvýšila či snížila a navíc při větším stresu pokračoval trend akumulace ve větším měřítku.
    - Jako vhodné markery by mohly sloužit proteiny číslo 4614, 8104 (zvyšující se akumulace při suchu) a 8001 (snižující se akumulace při suchu).

V řízených podmínkách sucha se podařilo od sebe statisticky signifikantně odlišit zkoušené odrůdy ječmenů ve fenofázi 4. pravého listu, a to jak za pomoci kvantitativního hodnocení akumulace DHN5, tak i rozdílnou akumulací různých typů dehydrinových

proteinů. Z těchto faktů lze vyvozovat závěr, že akumulace dehydrinů v rostlině lze považovat za slibný a aplikovatelný marker suchovzdornosti při prescreeningu genotypů. Obsah dehydrinů lze tedy za definovaných podmínek využít pro zjištění rozdílů reakcí jednotlivých odrůd a mohou tedy být využity při markery asistované selekci při šlechtění nových, výkonnějších a odolnějších odrůd této důležité zemědělské plodiny. Přesně definované zatížení rostlin stresem ve spojitosti s přesně určenými podmínkami pěstování rostlin, je nutno považovat za jeden ze základních předpokladů aplikace dehydrinových proteinů jako markerů odolnosti.

Fyziologické charakteristiky pomohly přesně indikovat aktuální či dlouhodobější vodní stav rostlin ve vztahu k akumulaci dehydrinových proteinů. Šantrůček (2008) uvádí, že i dočasný nedostatek vody se projeví menším množstvím fixovaného CO<sub>2</sub> a akumulované sušiny. Efektivita využití vody (WUE), na kterou lze usuzovat dle Farquhar *et al.* (1982) dle charakteristiky  $\Delta^{13}\text{C}$  ukázala, že všechny odrůdy za optimálních vodních poměrů využívají vodu zhruba stejně efektivně, byť s tendenčními rozdíly (odrůda Akcent využívala i za optimálních vlhkostních podmínek vodu efektivněji, než ostatní testované odrůdy). V rámci stresovaných variant vykazovaly jednotlivé odrůdy opět tendenční rozdíly, byť ne vždy byly potvrzeny statistickou analýzou. Je ovšem nutno si uvědomit, že vysoká hodnota WUE na úrovni listu a rostliny není zárukou vysoké WUE v agronomickém smyslu (poměr výnosu zrna a spotřebované vody za život rostliny). Interferující vlivy sklizňového indexu, frakce vody vypařené z povrchu půdy a rychlosti zapojení porostu vedou k tomu, že výnosné odrůdy nemusí nutně vyznačovat nízkou hodnotou  $\Delta^{13}\text{C}$  v jejich sušině. Řešení problémů může přinést spojené úsilí fyziologů, šlechtitelů a molekulárních biologů (např. nalezení QTL pro znak účinnosti využití vody (Šantrůček, 2010).

Většina publikovaných prací ukazuje na to, že u obilnin vyšší výnos často poskytují genotypy s nižší listovou účinností využití vody. Příčina je pravděpodobně v tom, že se mnoho rostlin včetně pšenice a zřejmě trav obecně chová „konzervativně“, tj. při nízkém  $c_i/c_a$  a tedy vysoké WUE indikované malou hodnotou diskriminace, rostlinou rostou méně i tehdy a právě tehdy, když jsou dobře zásobené vodou. Zachovávají si totiž nízkou vodivost průduchů (a tím nízké  $c_i$ ) i přes třeba výjimečný sezónní dostatek vody. Očekávaný negativní vztah mezi diskriminací a výnosem biomasy nebo zrna (a pozitivní mezi WUE a výnosem) se u nich projeví jen při deficitu vody. Tedy jinými slovy, nízké  $c_i$  není způsobena zvýšenou karboxylační kapacitou fotosyntetického aparátu ale přivřením průduchů. Pozitivní korelace diskriminace a růstu se dá v některých případech vysvětlit také fenologickými fázemi vývoje rostlin. Rostliny s vyšším  $\Delta^{13}\text{C}$  mají často rychlý růst v začátku vegetace, který vede



k zastínění povrchu půdy listy a následnému nižšímu výparu během vegetační doby. Většina vody v půdě tak zůstává k dispozici pro transpiraci rostliny.

Další aplikované fyziologické charakteristiky, které odrážejí aktuální vodní stav rostlin, vodní sytostní deficit a osmotický potenciál jsou v negativní korelaci, neboť ztráta vody z buněk je spouštěcím mechanismem pro syntézu osmoticky aktivních látek tzv. osmoprotektantů. Tento fenomén je považován za jeden z nejčastějších a nejběžnějších obranných mechanismů rostlin při stresech asociovaných s dehydratací buněk.

## 8 VYUŽITELNOST POZNATKŮ PROTEOMIKY VE ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN

Stres je spojen s inhibicí aktivního růstu a také se sníženou regulací fotosyntetického procesu rostliny. Namísto biosyntézy nových buněčných komponent, je buněčný mechanismus „přesměrován“ k biosyntéze rozličných protektivních látek. Změny v transkriptomu, proteomu a metabolomu rostliny vede k ustavení nové buněčné rovnováhy (homeostáze) při působení stresu a během fáze aklimatizace. Protože je proces aklimatizace asociován s *de novo* syntézou ochranných látek, je tento proces zcela logicky spojen se zvýšeným energetickým požadavkem rostliny. Proto je zvýšená tolerance k danému stresu obvykle pozorována u těch rostlin, které mohou udržovat zvýšenou fotosyntézu a asimilaci uhlíku i při stresových podmínkách (Tuomainen *et al.*, 2006). Stres suchem indukuje významné změny v metabolismu uhlíku včetně jeho fixace (Calvinův cyklus, ale často také proteiny asociované s primární fotosyntetickou reakcí jako je fotosyntetický elektronový transportní řetězec) a metabolismu karbohydrátů (enzymy zapojené v glykolýze, biosyntéze UDP-glukosy, sacharosy a jiných oligosacharidů) (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007). Nedostatek vody také vyúsťuje ve zvýšenou akumulaci kompatibilních osmolytů a hydrofilních COR/LEA proteinů s ochrannou a vodu vazebnou funkcí (Battaglia *et al.*, 2008).

Rostliny obecně odpovídají na různé abiotické stresy prostřednictvím aktivací vícera ochranných mechanismů, jako například akumulací ROS „zhášecích“ enzymů a jiných komponent s antioxidačními vlastnostmi, chaperony zapojených při svinování nově vzniklých proteinů a zvýšenou aktivitu biochemických drah, které vedou k akumulaci osmoticky aktivních látek. Je samozřejmé, že existují rozdíly mezi úrovní tolerance rostlin k danému stresu, a to jak mezi druhy tak i uvnitř druhu, tedy mezi genotypy (Hajheidari *et al.*, 2007). Výsledky proteomických analýz ukazují, že rozdílná tolerance rostlin ke stresům je založena na tom, že tolerantní rostlina dokáže indukovat ochranné mechanismy mnohem efektivněji, než rostliny náchylné. Další důležitou vlastností tolerantních rostlin je schopnost udržet dostatečnou míru důležitých biochemicko-fyziologických procesů, zejména těch, které jsou asociovány s energetickým metabolismem (fotosyntéza, syntéza ATP), a to i za podmínek, které nejsou optimální pro růst a vývoj rostlin (Askari *et al.*, 2006). Schopnost udržet dostatečnou míru procesů asociovaných s energetickým metabolismem je velice důležitá pro efektivní aklimatizaci rostliny během stresu, neboť se jedná o aktivní proces spojený s *de novo* biosyntézou ochranných komponent, což je spjato se zvýšeným energetickým požadavkem (Bartels *et Sunkar*, 2005).

Téměř všechny proteiny (s výjimkou některých nízkomolekulárních peptidů, např. glutathionu, a produktů polymerizace glutathionu, např. fytochelatinů) vznikají translací zralých mRNA na ribosomálním aparátu (Kosová *et al.*, 2011a). Na první pohled by se tudíž mohlo zdát, že k porozumění odezvy rostlin na stres stačí studovat pouze změny na transkripční úrovni, tedy tzv. transkriptom. Výsledky studií stresové odezvy rostlin, kdy byly současně v daném okamžiku studovány změny jak na úrovni transkriptomu, tak na úrovni proteomu (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007) však ukazují, že odezva na stres na úrovni transkriptomu a proteomu se v daném časovém okamžiku významně kvalitativně i kvantitativně liší. Nelze proto na změny na úrovni proteomu usuzovat z výsledků transkriptomických studií. Proto je zkoumání změn v proteomu daleko důležitější, neboť proteiny jsou na rozdíl od transkriptů genů přímými efektory odpovědi rostliny na stres. Proteiny nezahrnují jen enzymy, které katalyzují biochemické reakce v buňce, ale jsou také součástí transkripčních a translačních mašinérií, a jako takové také regulují odpověď rostliny na stres na transkripční a proteinové úrovni.

Proteiny se také uplatňují v aklimatizaci rostlin na stresy, což vede ke změnám v plazmatické membráně, buněčné cytoplazmě, cytoskeletu a také ve složení intrabuněčných kompartmentů, což vede ke změně jejich vlastností, jako například změně afinity cytoplazmy k vodě (Kosová *et al.*, 2011a). Z výše uvedeného plyne, že změny v akumulaci proteinů při stresu jsou úzce spjaty s fenotypickou odpovědí rostliny na stres, což je *de-facto* determinující pro stupeň tolerance rostliny k danému stresu.

Proteomické srovnávací studie analyzující změny proteomů rostlin po zatížení stresem, mohou vést k identifikaci konkrétních diferenciallyně se exprimujících (akumulujících) proteinů mezi tolerantní či rezistentní odrůdou. Rozdíly v akumulaci proteinů mohou odrážet rozdílnou reakci na stres u různě odolných rostlin (odrůd) a tyto proteiny mohou být vhodnými kandidáty na nové proteinové markery odolnosti rostlin.

Analýzou dostatečného množství genotypů lišících se v daném znaku či vlastnosti (parametru), mohou být nalezeny specifické alely korespondující s konkrétními proteiny, které mohou být zodpovědné za variabilitu studované vlastnosti. Tyto alely, lišící se v kódující sekvenci genu nebo v promotoru, což samozřejmě koresponduje s diferencovanou expresí proteinu, mohou být uplatněny při markery asistované selekci (MAS) ve šlechtitelských programech zaměřených na zvyšování a zlepšování daných vlastností či znaků, jako například odolnost vůči stresu suchem. Proteomické studie tedy mohou významným způsobem přispět k detekci a identifikaci biomarkerů stresové tolerance rostlin.

Jako příklad může sloužit chladem indukovaný protein WCS120 u pšenice (Vítámvás *et al.*, 2007), protein DHN5 u ječmenů vystavných suchu (Škodáček *et* Prášil, 2011), protein sHSPs u obilek pšenice vystavených horku (Skylas *et al.*, 2002), protein Trx h a GST u obilek pšenice vystavených suchu (Hajheidari *et al.*, 2007) nebo Rubisco aktivasy a enzymů Calvinova cyklu u rostlin topolů (*Populus x euroamericana*) pěstovaných za sucha (Bonhomme *et al.*, 2009).

Pro testování kandidátních proteomických markerů lze dále využít technik genového inženýrství (např. transformace obilnin vektorem s transgenem kódující protein pro získání rostliny s vyšším či naopak s nižším obsahem daného proteinu). Vliv daného genu lze následně odečíst od fenotypové změny transformované rostliny oproti kontrole. Tento přístup vyžaduje nutnost ověření (např. osekvenování genomu, tvorba dostatečného množství transformantů), že fenotypový rozdíl není způsoben např. inaktivací jiných genů, způsobeného vložením transgenů do regulační sekvence jiných genů. Techniky genového inženýrství jsou ovšem nezbytné, pokud neexistuje široký soubor fenotypově popsaných genotypů toho samého druhu lišících se ve zkoumané vlastnosti. Tento problém však u druhu *Hordeum vulgare* L. nenastává. Pokud tedy existují genotypy lišící se ve zkoumané vlastnosti, tak je lze s výhodou využít pro testování možných markerů kvantitativními metodami (např. imunologickou metodou Western blot) na těchto genotypech.

## 9 PUBLIKACE DOKTORANDA

### Článek v impaktovaném periodiku

Vítámvás, P. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Prášil, I.T.: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy*, 104, 2010: 671-676

### Články v recenzovaném periodiku

Sedláková, V. – Sedlák, P. – Vejl, P. – Domkářová, P. – Horáčková, V. – Škodáček, Z.: Charakterizace vybraných diploidních genetických zdrojů. *Agriculture* 55, 2009: 17-25

Škodáček, Z. – Prášil, I.T.: Nové možnosti studia suchovzdornosti ječmene (*Hordeum vulgare* L.). *Úroda* 8, 2011: 24-28

### Kapitoly v odborné knize

Škodáček, Z. – Prášil, I.T.: Suchovzdornost rostlin a její genetická a biochemická podstata. In: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2012, Bláha, L., Šerá, B., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha, Ústav nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AV ČR, v.v.i. Hové Hrady, 2012: 62-77

Škodáček, Z. – Prášil, I.T. – Vejl, P.: Možnosti transgenoze při zvyšování tolerance rostlin k abiotickým stresům, zejména nízkým teplotám. In: Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin (vybrané kapitoly), Bláha, L., Hnilička, F., Martinková, J., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2010: 84-95

Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášil, I.T. – Vejl, P.: Fenomén proteinů a kyseliny abscisové ve vztahu k abiotickému stresu u rostlin, zejména k suchu. In: Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2011, Bláha, L., Hnilička, F., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2011: 113-133

### Recenzované články ve sbornících

Škodáček, Z. – Prášil, I.T. – Kosová, K. – Vítámvás, P.: Studium suchovzdornosti ječmene (*Hordeum vulgare*) pomocí dehydrinových markerů a vybraných fyziologických charakteristik vodního stavu rostlin. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na

vlastnosti rostlin 2010, Bláha, L. – Hnilička, F. – Martinková, J., Eds. VÚRV.v.v.i. & ČZU v Praze, 2010: 285-288

Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášil, I.T.: Studium akumulace dehydrinů a obsahu kyseliny abscisové ve vztahu k suchovzdornosti jarního ječmene. Úroda 12, vědecká příloha, 2010: 211-214.

### **Články ve sborníku**

Prášil, I.T. – Kosová, K. – Vítámvás, P. – Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášilová, P.: Dehydriny – ukazatele odolnosti ječmenů k chladu, suchu a zasolení. „Aplikované rostlinné biotechnologie“, konference ke 100. výročí založení vědeckého pracoviště Mendeleum, Lednice 2012: 210-213

Prášil, I.T. – Vítámvás, P. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Zelenková, S.: Využití proteomiky při studiu stresů rostlin. In. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2009, Bláha, L. – Hnilička, F. – Martinková, J., Eds. VÚRV.v.v.i. & ČZU v Praze, 2009: 29-35

Škodáček, Z. – Sedlák, P.: Studium odolnosti vybraných klonů *Solanum bulbocastanum* k *Phytophthora infestans*. In: Osivo a sadba, Pazderů, K., Eds. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2009: 132-137

### **Abstrakta ve sborníku**

Sedláková V. – Sedlák P. – Vejl P. – Škodáček, Z. – Domkářová J. – Horáčková V.: Charakterizace vybraných diploidních genetických zdrojů rodu *Solanum* určených pro somatickou hybridizaci s dihaploidy bramboru. In.: Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, 2008: 21

Kosová, K. – Vítámvás, P. – Škodáček, Z. – Prášil, I.T.: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití ve výzkumu rostlinného proteomu. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2009: 23

- Kosová, K. – Vítámvás, P. – Prášilová, P. – Prášil, I.T. – Škodáček, Z.: The Possibilities of the Use of Dehydrins as Markers of Frost Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare*) and Wheat (*Triticum aestivum*). In.: Green Plant Breeding Technologies, International Conference, Vienna, Austria, 2010: 64
- Vítámvás, P. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Pánková, K. – Milec, Z. – Planchon, S. – Renault, J. – Prášil, I.T.: Quantitative Analysis of Proteome in Wheat Substitution Lines During Long-term Cold Acclimation. In.: Green Plant Breeding Technologies, International Conference, Vienna, Austria, 2010: 66
- Vítámvás, P. – Prášil, I.T. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Planchon S. – Renault, J.: DIGE Analysis of Proteome and Frost Tolerance in Chromosome 5A and 5B Reciprocal Substitution Lines Between two Winter Wheat During Cold Acclimation. In.: Proteomics in Plants, Microorganisms and Environment, Renault, J., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Eds. International Conference, Luxembourg, 2010: 46
- Vítámvás, P. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Planchon, S. – Renault, J. – Prášil, I.T.: Analýza proteomu u substitučních linií ozimé pšenice v průběhu dlouhodobého otužení. In.: Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2, 2010: 124
- Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášil, I.T.: Studium akumulace dehydrinů a obsahu kyseliny abscisové ve vztahu k suchovzdornosti jarního ječmene. In.: Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2, 2010: 169

## 10 POUŽITÁ LITERATURA

- Abe, H. – Urao, T. – Ito, T. – Seki, M. – Shinozaki, K. – Yamaguchi-Shinozaki, K.: Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15, 2003: 63-78
- Abe, H. – Yamaguchi-Shinozaki, K. – Urao, T. – Iwasaki, T. – Hosokawa, D. – Shinozaki, K.: Role of Arabidopsis MYC and MYB homologues in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9, 1997: 1859-1868
- Alexandersson, E. – Fraysse, L. – Sjövall-Larsen, S. – Gustavsson, S. – Fellert, M. – Karlsson, M. – Johanson, U. – Kjellbom, P.: Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59, 2005: 469-484
- Allagulova, Ch.R. – Gimalov, F.R. – Shakirova, F.M. – Vakhitov, V.A.: The Plant Dehydrins: Structure and Putative Function. *Biochemistry* 68, 2003: 945-951
- Asghari, R. – Ebrahimzadeh, H.: Drought stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5,-biphosphate carboxylase/oxygenase protein. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A* 30 (A1), 2006: 1-7
- Askari, H. – Edqvist, J. – Hajheidari, M. – Kafi, M. – Salekdeh, G.H.: Effect of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptiaca leaves. *Proteomics* 6, 2006: 2542-2554
- Atienza, S.G. – Faccioli, P. – Perrotta, G. – Dalfino, G. – Zschiesche, W. – Humbeck, K. – Stanca, M. – Cattivelli, L.: Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167, 2004: 1359-1365
- Aval'baev, A.M. – Bezrukova, M.V. – Shakirova, F.M.: Multiple hormonal control of the lectin content in roots of wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 2001: 620-623
- Baker, J. – dennSteele, Ch. – Dure, L.: Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11, 1988: 277-291



- Bano, A – Rehman, A. – Winiger, M.: Altitudinal variation in the content of protein, proline, sugar and abscisic acid (ABA) in the alpine herbs from Hunza Valley, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 41, 2009: 1593-1602
- Barlow, M. – Clarke, T.: *Blue gold: The fight to stop the corporate theft of the world's water.* The New Press, New York, 2002: 228
- Bartels, D. – Sunkar, R.: Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 2005: 23-58
- Battaglia, M. – Olvera-Carillo, Y. – Garcarrubio, A. – Covarrubias, AA: The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 48, 2008: 6-24
- Beemster, G. – Fiorani, F. – Inzé, D.: Cell cycle: the key to plant grow control? *Trends in Plant Science*, 8, 2003: 154-158
- Beck, E. H. – Fettig, S. – Knake, C. – Hartig, K. – Bhattarai, T.: Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* 32, 2007: 501-510
- Bláha, L. – Hnilička, F.: *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2008,* Česká zemědělská univerzita v Praze, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha – Ruzyně, 2008: 12-17
- Bogeat-Triboulot, MB. – Brosché, M. – Renaut, J. – Jouve, L. – Le Thiec, D. – Fayyaz, P.: Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, exophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid region. *Plant Physiology* 143, 2007: 876-892
- Bonetta, D. – McCourt P.: Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science* 3, 2002: 231-235
- Bonhomme, L. – Monclus, R. – Vincent, D. – Carpin, S. – Lomenech, A.M. – Plomion, C. – Brignolas, F. – Morabito, D.: Leaf proteome analysis of eight *Populus×euramericana*

- genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics* 9, 2009: 4121-4142
- Bray, E.A.: Regulation of gene expression during abiotic stresses, and the role of the plant hormone abscisic acid. In: *Handbook of Plant and Crop Physiology*, Pessaraki, M., Eds. New York: Marcel Dekker Inc., 1995: 733-752
- Bray, E.A. – Bailey-Serres, J. Weretilnyk, E.: Response to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*, Buchanan, B – Gruissem, W. – Jones, J., Eds. American Society of Plant Physiologists 2000: 1158-1202
- Brestič, M. – Olšovská, K.: Vodný stres rostlín, príčiny, dosledky, perspektivy. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2001: 149
- Brini, F. – Hanin, M. – Lumbreras, V. – Amara, I. – Khoudi, H. – Hassairi, A. – Page's, M. – Masmoudi, K: Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 26, 2007: 2017-2026
- Close, T.J.: Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 1996: 795-803
- Close, T.J.: Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100, 1997: 291-296
- Close, T.J. – Choi, D.W. – Campbell, S.A. – Koag, M.Ch. – Zhu, B.: The dehydrin multigene family in the *Triticeae* and maize. In: *Approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments. A strategic Planning Workshop held at CIMMYT, El Batan, Mexico, 21-25 June 1999*: 167-171
- Close, T.J. – Choi, D.W. – Venegas, M. – Salvi, S. – Tuberosa, R. – Ryabushkina, N. – Turuspekov, Y. – Nevo, E.: Allelic Variation in Wild and Cultivated Barley at the Dhn4 Locus, Which Encodes a Major Drought-Induced and Seed Protein, DHN4. *Barley Genetics VIII*, 2000: 249-250

- Close, T. J. – Fenton, R. D. – Moonan, F.: A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Molecular Biology* 23, 1993: 279-286
- Close, T.J. – Meyer, N.C. – Radik, J.: Nucleotide sequence of a gene encoding a 58,5-kilodalton barley dehydrin that lacks a serine tract. *Plant Gene Register. Plant Physiology* 107, 1995: 289-290
- Collinsová, M. – Jiráček, J.: Současný vývoj v proteomice. *Chemické listy* 98, 2004: 1112-1118
- Cutler, S.R. – Rodriguez, P.L. – Finkelstein, R.R. – Abrams, S.R.: Abscisic acid: emergence of a core signalling network. *Annual Reviews Plant Biology* 61, 2010: 651-679
- Čatský, J.: Water Saturation Deficit in the Wilting Plant. The Preference of Young Leaves and the Translocation of Water from Old into Young Leaves. *Biologia Plantarum (Praha)* 4, 1962: 306 – 314
- Čimo, J. – Igaz, D. – Bárek, V.: Hodnotenie sucha na základě agroklimatických a podnych faktorov. In: *Bioklimatologické aspekty hodnocení procesů v krajině*, Rožňovský, J. – Litschmann, T., Eds. Mikulov 9 – 11. 9. 2008: 51-59
- Davies, W.J – Bacon, M.A.: Adaptation of root to drought. In: *Root Ecology (ecological Studies)*, De Kroon, H. – Visser, E.J.W., Eds. Springer, 2003: 173-192
- Domon, B. – Aebersold, R.: Mass Spectrometry and protein Analysis. *Science* 312, 2006: 212-217
- Dhekney, S. A. – Litz, R.E. – Moraga Amador, D. A. – Yadav, A.K.: Potential for introducing cold tolerance into papaya by transformation with C-repeat binding factor (CBF) genes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. – Plant.* 43, 2007: 195-202
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., Hubick, T. K: Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 1989: 503-537

- Farquhar, G.D. – O'Leary, M.H. – Berry, J.A.: On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 1982: 121-137
- Fella, K. – Glückmann, M. – Hellmann, J. – Kras, M. – Kramer, P.J. – Kröger, M.: Use of two-dimensional gel electrophoresis in predictive toxicology: Identification of potential early protein biomarkers in Chemical induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 5, 2005: 1914-1927
- Ferus, P.: Reaktivne formy kyslíka v tolerancii rastlín na sucho. . In: Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu, Bláha, L. – Hnilička, F., Eds, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2011: 55-80
- Fujii, H. – Verslues, P.E. – Zhu, J.K.: Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19, 2007: 485-494
- Fujita, Y. – Nakashima, K. – Yoshida, T. – Katagiri, T. Kidokoro, S. – Kanamori, N. – Umezawa, T. – Fujita, M. – Maruyama, K. – Ishiyama, K. – Kobayashi, M. – Nakasone, S. – Yamada, K. – Ito, T. – Shinozaki, K. – Yamaguchi-Shinozaki, K.: Three SnRK<sub>2</sub> protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signalling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Biology*. 50, 2009: 2123-2132.
- Gao, Y. – Zeng, Q. – Guo, J. – Cheng, J. – Ellis, B. – Chen, J.: Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 52, 2007: 1001-1013.
- Gaspar, T. – Franck, T. – Bisbis, B. – Kevers, C. – Jouve, L. – Hausman, J.F. – Dommes, J.: Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37, 2002: 263-285.
- Gloser, J. – Prášil, I.T.: Fyziologie stresu. In: Fyziologie rostlin. Praha, Academia, Kapitola 15, 1998: 412-431

- Godula, M.: Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku (AP-MALDI) – nový směr v analýze peptidů a proteinů. *Chemické listy* 99, 2005: 930-936
- Gómez-Cadenas, A. – Verhey, S.D. – Holappa, L.D. – Shen, Q. – Ho, T.-H.D. – Walker-Simmons, M.K.: An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1999: 1767-1772
- Guillaumot, D. – Gillon, S. – Déplanque, T. – Vanhee, C. – Gumy, Ch. – Masquelier, D. – Morsomme, P. – Batoko, H.: The Arabidopsis TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmatic reticulum-Golgi-localized membrane protein. *The Plant Journal* 60, 2009: 242-256
- Guo, P. – Baum, M. – Grando, S. – Ceccarelli, S. – Bai, G. – Li, R. – von Korff, M. – Varshney, R.K. – Graner, A. – Valkoun, J.: Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 12, 2009: 3531-3544
- Gupta, U.S.: Drought tolerance. In: *Physiology of stressed crops*. Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia, USA, 2005: 62
- Hao, Q. – Yin, P. – Yan, Ch. – Yuan, X. – Li, W. – Zhang, Z. – Liu, L. – Wang, J. – Yan, N.: Functional mechanism of the abscisic acid agonist pyrabactin. *Journal of Biological Chemistry* 285, 2010: 28946-28952
- Hajheidari, M. – Eivazi, A. – Buchanan, B.B. – Wong, J.H. – Majidi, I. – Salekdeh, G.H.: Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research* 6, 2007: 1451-1460
- Hara, M. – Terashima, S. – Fukaya, T. – Kuboi, T.: Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217, 2003: 290-298

- Hong-Bo, S. – Zong-Suo, L. – Ming-An, S.: LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 2005: 131-135
- Horák, V. – Staszková, L.: *Biochemie*. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2. vydání, Praha, 2002.
- Houde, M. – Dallaire, S. – N'Dong, D. – Sarhan, F.: Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnology Journal*. 2, 2004: 381-387
- Houde, M. – Allard, F. – Laliberé, S.: Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* 8, 1995: 583-593
- Huang, J. – Sun, S.J. – Xu, D.Q. – Yang, X. – Bao, Y.M. – Wang, Z.F. – Tang, H.J. – Zhang, H.: Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stress mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 389, 2009: 556-561
- Huizinga, D.H. – Omosogbon, O. – Omery, B. – Crowell, D.N.: Isoprenylcysteine methylation and demethylation regulate abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2008: 2714-2728
- Chen, J., Chang, S.X., Anyia, O.: The Physiology and Stability of Leaf Carbon Isotope Discrimination as a Measure of Water-Use Efficiency in Barley on the Canadian Prairies. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 197, 2011: 1-11
- Chen, T.H.H. – Murata, N.: Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 2002: 250-257
- Chloupek, O. – Hrstková, P.: Adaptation of crops to environment. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 2005: 1316-1321

- Chmelík, J.: Proteomický průvodce. Chemické listy 99, 2005: 883-885
- Cheng, L. – Huang, S. – Sheng, Y. – Hua, X. – Shu, Q. – Song, S. – Jing., X.: GMCHI, cloned form soybean [*Glycine max* (L.) Meer.], enhances survival in transgenic *Arabidopsis* under abiotic stress. *Plant Cell Rep.* 28, 2009: 145-153
- Cho, E.K. – Choi, Y.J.: A nuclear-localized HSP70 confers thermoprotective activity and drought-stress tolerance on plants. *Biotechnology Letters* 31, 2009: 597-606
- Choi, D. W. – Close, T. J.: A newly identified barley gene, Dhn12, encoding a YSK2 DHN, is located on chromosome 6H and has embryo specific expression. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 2000: 1274-1278
- Choi, D. W. – Zhu, B. – Close, T. J.: The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1999: 1234-1247
- Ingram, J. – Bartles, D.: The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 1996: 377-403
- Iuchi, S.M. – Kobayashi, T. – Taji, M. – Naramoto, M – Seki, T. – Kato, S. – Tabata, Y. – Kakubari, K. – Yamaguchi-Shinozaki – Shinozaki, K.: Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 27, 2001: 325-333.
- Jang, I.Ch. – Oh, S.J. – Seo, J.S. – Choi, W.B. – Song, S.I. – Kim, Ch.H. – Kim, Y.S. – Seo, H.S. – Choi, Y.D. – Nahm, B.H. – Kim, J.K.: Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* 131, 2003: 516-524
- Jiang, Y. – Huang, B.: Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. *Crop Science* 42, 2002: 202-207

- Kang, J. – Hwang, J.-U. – Lee, M. – Kim, Y.-Y. – Assmann, S. – Martinoia, E. – Lee, Y.: PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107 (5), 2010: 2355-2360.
- Kang, J. – Choi, H. – Im, M. – Kim, S.Y.: Arabidopsis Basis leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 14, 2002: 343-357
- Kim, Y.H. – Lim, S. – Yang, K.S. – Kim, Ch.Y. – Kwon, S.Y. – Lee, H.S. – Wang, X. – Zhou, Z. – Ma, D. – Yun, D. – J., Kwak, S.S.: Expression of Arabidopsis NDPK2 increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants. *Molecular Breeding*. 24, 2009: 233-244
- Kim, S. – Kang, J.Y. – Choi, D.I. – Park, J.H. – Kim, S.Y.: ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant journal* 40, 2004:75-84
- Kline, K.G. – Sussman, M.zr. – Jones, A.M.: Abscisic acid receptors. *Plant Physiology* 154, 2010: 479-482.
- Kodíček, M.: Biochemické pojmy: výkladový slovník online. VŠCHT Praha, 2007. Dostupné z [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/index.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/index.html)
- Kosová, K. – Prášil, I.T. – Vítámvás, P.: Role of Dehydrins in Plant Stress Response. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Pessarakli, M., Eds. Third edition, CRC Press, 2010: 213-286
- Kosová, K. – Vítámvás, P. – Prášil, I.T.: The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* 51, 2007: 601-617
- Kosová, K. – Vítámvás, P. – Prášil, I. T., a: Využití proteomiky k pochopení odezvy rostlin na stres. In: Bláha, L. – Hnilička, F.: *Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2011*. ISBN: 978-80-7427-069-7 (VÚRV v.v.i.), 159-192



- Kosová, K. – Vítámvás, P. – Prášil, I.T. – Renaut, J., b: Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 74, 2011: 1301-1322
- Kovářová, H.: Proteomika v postgenomové době. *Chemické listy* 99, 2005: 886-889
- Laemmli, U.K: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 1970: 680-685
- Lam, E.: Nucleic acids and proteins. In: *Plant Biochemistry*, Dey, P.M. - Harborne, J.B., Eds. Academic Press, 1997: 315-352
- Larcher, W.: *Physiological plant ecology*. Berlin, Springer, 2003: 523
- Li, J. – Assmann, S.M.: An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *The Plant Cell* 8, 1996: 2359-2368
- Lindsey, K. – Topping, J.: On the relationship between the plant cell and the plant. *Seminars in Cell and Development Biology*, 9, 1998: 171-177
- Liu, X. – Yue, Y. – Li, B. – Nie, Y. – Li, W. – Wu, W.-H. –Ma, L.: A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 2007: 1712-1716
- Ma, Y. – Szostkiewicz, I. – Korte, A. v Moes, D. – Yang, Y. – Christmann, A. – Grill, E.: Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 2009: 1064-1068
- Masarovičová, E. – Král'ová, K. – Májeková, M. – Vykuková, I.: Vodný režim rásltín v meniacich sa environmentálnych podmienkach. In: *Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu*, Bláha, L. – Hnilička, F., Eds, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2011: 81-91

- Macháčková, I.: Růst a vývoj: Růstové regulátory. In: Fyziologie rostlin. Praha, Academia, Kapitola 8, 1998: 412-431
- Malatrasi, M. – Close, T.J. – Marmioli, N.: Identification and mapping of a putative stress response regulator gene in barley. *Plant Molecular Biology* 50, 2002: 143-152
- Mattana, M. – Biazzi, E. – Consonni, R. – Locatelli, F. – Vannini, C. – Provera, S. – Coraggio, I.: Overexpression of *Osm4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 125, 2005: 212-223
- McKersie, B.D. – Chen, Y. – de Beus, M. – Bowley, S. R. – Bowler, Ch. – Inzé, D. – D'Halluin, K. – Botterman, J.: Superoxide Dismutase Enhances Tolerance of Freezing Stress in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 103, 1993: 1155-1163
- Melcher, K. – Ng, L.-M. – Zhou, X.E. – Soon, F.-F. – Xu, Y. – Suino-Powell, K.M. – Park, S.-Y. – Weiner, J.J. – Fujii, H. – Chinnusamy, V. – Kovach, A. – Li, J. – Wang, Y. – Li, J. – Peterson, F.C. – Jensen, D.R. – Yong, E.-L. – Volkman, B.F. – Cutler, S.R. – Yhu, J.-K. – Xu, H.E.: A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 2009: 602-608.
- Meloun, M. – Militký, J. – Hill, M.: Počítačová analýza vícerozměrných dat. Academia, 2005: 450 s., ISBN: 8020013350
- Morgan, J.M.: Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35, 1984: 299-319
- Mundy, J. – Chua, N. H.: Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO Journal* 7, 1988: 2279-2286
- Muscietti, J. – McCormick, S.: Abscisic acid (ABA) receptors: light at the end of the tunnel. *F1000 Biology Reports* 2 (15), 2010

- Nanjo, T. – Kobayashi, M. – Yoshiba, Y. – Kukubari, Y. – Yamaguchi-Shinozaki, K. – Shinozaki, K.: Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 461, 1999: 205-210
- Neumann, P.M: Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Annals of Botany*, 101, 2008: 901-907
- Nevo, E. – Chen, G.: Drought and salt tolerance in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell and Environment* 33, 2010: 670-685
- O'Farrell, P.H: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 1975: 4007-4021
- Ondřej, O. – Drobník, J.: *Transgenoze rostlin*. Academia. 2002: 316, ISBN 80-200-0958-2
- Pandey, S. – Chen, J.-G., – Jones, A.M. – Assmann, S.M.: G-Protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiology* 141, 2006: 243-256
- Pandey, S. – Nelson, D.C. – Assmann, S.M.: Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136, 2009: 136-148
- Park, So-Y. – Noh, Kyu-J. – Yoo, Jeong-H. – Yu, Jae-W. – Lee, Byun-W. – Kim, Jung-G. – Seo, H.S. – Paek, Nam-Ch.: Rapid Upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in Response to Dehydration Is a Characteristic of Drought-Tolerant Genotypes in Barley. *Journal of Plant Biology* 49: 2006: 455-462
- Peng, Y. – Lin, W. – Cai, Q. – Arora, R.: Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 226, 2007: 729-740
- Peumans, W.J. – Van Damme, E.J.M.: Lectins as plant defence proteins. *Plant Physiology* 109, 1995: 347-352

- Pospíšilová, J.: Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum* 46 (4), 2003: 491-506.
- Potop, V. – Türkott, L. – Kožnarová, V. – Možný, M.: Drought episodes in the Czech Republic and their potential effects in agriculture. *Theoretical and Applied Climatology*, 99, 2009: 373-388
- Potters, G. – Pasternak, T.P. – Guisez, Y. – Palme, K.J. – Jansen, M.A.K.: Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 2007: 98-105
- Prášil, I.T. – Prášilová, P. – Mařík, P.: Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crop Research* 102, 2007: 1-8
- Procházka, S. – Borkovec, V.: Kyselina abscisová. In: Procházka, S. – Šebánek, J. a kol.: *Regulátory rostlinného růstu*. Academia, Praha, 1997: 80-83
- Procházka, S. – Macháčková, I. – Krekule, J. – Šebánek, J. a kol.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 1998, 484 s., ISBN 80-200-0586-2
- Prusinkiewicz, P. – Rolland-Lagan, A.G.: Modeling plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 2006: 83-88
- Raikhel, N. – Chrispeels, M.J.: Protein sorting and vesicle traffic. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*, Buchanan, B. – Gruissem, W. – Jones, J., Eds. American Society of Plant Physiologists, 2000: 160-201
- Razem, F.A. – El-Kereamy, A. – Abrams, S.R. – Hill, R.D.: The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439, 2006: 290-294
- Riechmann, J.L. – Heard, J. – Martin, G. – Reuber, L. – Jiang, C. – Keddie, J. – Adam, L. – Pineda, O. – Ratcliffe, O.J. – Samaha, R.R.: *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2000: 2105-2110

- Risk, J.M. – Macknight, R.C. – Day, C.L.: FCA is not an ABA receptor. *Nature* 456, 2008: E5-E6
- Rodriguez, P.L. – Benning, G. – Grill, E.: ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 4421, 1998: 185-190.
- Rodríguez, E., M., Svensson, J. T., Malatrasi, M., Choi, D. –W, Close, T. J.: Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 2005: 852-858
- Rosypal, S. – Doškař, J. – Pantůček, R. – Kailerová, J. – Relichová, J. – Růžičková, V. – Šmarda ml., J. – Šmarda, J. – Štěpán, J.: Terminologie molekulární biologie. Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc, 1. vydání, Brno, 2001
- Řehulka, P. – Řehulková, H. – Chmelík, J.: Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace. *Chemické listy* 101, 2007: 279-286
- Sakamoto, A. – Alia, – Murata, N.: Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* 38, 1998: 1011-1019
- Sakamoto, A. – Valverde, R. – Alia, – Chen, T.H.H. – Murata, N.: Transformation of *Arabidopsis* with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *The Plant Journal*. 22, 2000: 449-453
- Sakuma, Y. – Liu, Q. – Dubouzet, J.G. – Abe, H. – Shinozaki, K. – Yamaguchi-Shinozaki, K.: DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communication* 25, 2002: 998-1009
- Sauter, A. – Dietz, K-J. – Hartung, W. : A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root to shoot signalling. *Plant Cell Environment* 25, 2002: 223-228

- Sato, Y. – Yokoya, S.: Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports* 27, 2008: 329-334
- Sharma, P. – Dubey, R.S.: Protein synthesis by plants under stressful conditions. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Pessarakli, M., Eds. Third edition, CRC Press, 2010: 465-518
- Shou, H. – Bordallo, P. – Fan, J.B. – Yeakley, J. – M. – Bibikova, M. – Sheen, J. – Wang, K.: Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2004: 3298-3303
- Schneider, L.V. – Hall, M.P.: Stable isotope methods for high-precision proteomics. *Drug Discovery Today* 10, 2005: 353 – 363
- Signora, L. – De Smet, I. – Foyer, C.H. – Zhang, H.: ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 28, 2001: 655-662
- Skyllas, D.J. – Cordwell, S.J. – Hains, P.G. – Larsen, M.R. – Basseal, D.J. – Walsh, B.J.: Heat shock of wheat during grain filling proteins associated with heat-tolerance. *Journal of Cereal Science* 35, 2002: 175-188
- Slováková, L'. – Mistrík, I.: *Fyziologické procesy rastlín v podmienkach stresu*. Univerzita Komenského v Bratislavě, 2007: 238
- Snustad, D.P. – Simmons, M.: *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno, 2009
- Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M.-Y., Ischiropoulos, H.: Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Letters* 474, 2000: 116-119

- Spremulli, L.: Protein Synthesis, assembly and degradation. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plant, Buchanan, B. – Gruissem, W. – Jones, J., Eds. American Society of Plant Physiologists, 2000: 1158-1202
- Suprunova, T. – Krugman, T. – Fahima, T. – Chen, G. – Shams, I. – Korol, A. – Nevo, E.: Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. Plant, Cell and Environment 27, 2004: 1297-1308
- Svensson, J. – Ismail, A.M. – Palva, E.T. – Close, T.J.: Dehydrins. In: Sensing, signalling and cell adaptation, Storey, K.B. – Storey, J.M. Elsevier Science, 2002: 155-170
- Sun, X. – Xi, D.H. – Feng, H. – Du, J.B. – Lei, T. – Liang, H.G. – Lin, H.H.: The Dual Effects of Salicylic Acid on Dehydrin Accumulation in Eater Stressed Barley Seedlings. Russian Journal of Plant Physiology 56, 2009: 348-354
- Šamaj, J. – Thelen, J.,J.: Plant Proteomics. Springer, 369 s., 2007, ISBN 978-3-540-72616-6
- Šantrůček, J.: Nové možnosti hledání účinnějších konzumentů vody. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2008, Bláha, L. – Hnilička, F. – Martinková, J., Eds. VÚRV.v.v.i. & ČZU v Praze, 2008: 48-53
- Šantrůček, J.: Nové možnosti šlechtění na vyšší účinnost využití vody. In: Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin (vybrané kapitoly), Bláha, L. – Hnilička, F. – Martinková, M., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2010: 139-154
- Škodáček, Z. – Prášil, I. T.: Nové možnosti studia suchovzdornosti ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Úroda 8, 2011: 24-28
- Škodáček, Z. – Prášil, I.T. – Vejl, P. a: Možnosti transgenoze při zvyšování tolerance rostlin k abiotickým stresům, zejména nízkým teplotám. In: Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin (vybrané kapitoly), Bláha, L. –

- Hnilička, F. – Martinková, J., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2010: 84-95.
- Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášil, I.T. – Vejl, P.: Fenomén proteinů a kyseliny abscisové ve vztahu k abiotickému stresu u rostlin, zejména k suchu. In: Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2011, Bláha, L, Hnilička, F., Eds. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2011: 113-133
- Škodáček, Z. – Vlasáková, E. – Prášil, I.T. b: Studium akumulace dehydrinů a obsahu kyseliny abscisové ve vztahu k suchovzdornosti jarního ječmene. Úroda 12, vědecká příloha, 2010: 211-214.
- Štosová, T. – Havliš, J. – Lenobel, R. – Šebela, M.: Proteolytické enzymy: Význam pro proteomiku. Chemické listy 99, 2005: 896-905
- Tähtiharju, S. – Palva, T.: Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 26, 2001: 461-470
- Taiz, L., Zeiger, E.: Plant Physiology. Sunderland, Sinauer Associates, 2002: 536
- Tommasini, L. – Svensson, J. T. – Rodriguez, E. M. – Wahid, A. – Malatrasi, M. – Kato, K. – Wanamaker, S. – Resnik, J. – Close, T. J.: Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Functional and Integrative Genomics 8, 2008: 837-405
- Tuomainen, M.H. – Nunan, N. – Lehesranta, S.J. – Tervahauta, A.I. – Hassinen, V.H. – Schat, H.: Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. Proteomics 6, 2006: 3696-3706
- Umezawa, T. – Sugiyama, N. – Mizoguchi, M. – Hayashi, S. – Myouga, F. – Yamaguchi-Shinozaki, K. – Ishihama, Y. – Hirayama, T. – Shinozaki, K.: Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 106, 2009: 17588-17593



- Ünlü, M. – Morgan, M.E. – Mindlen, J.S.: Difference gel electrophoresis. A single gel method for detection of changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 1997: 2071-2077
- Valla, M., Kozák, J., Němeček, J., Matula, S., Borůvka, L., Drábek, O.: *Pedologické praktikum*. Česká zemědělská univerzita 2004
- Vaňková R.: Plant hormone functions in abiotic and biotic stress responses. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Pessarakli, M., Eds. Third edition, CRC Press, 2010: 191-211
- Vaseva, I.I. – Grigorova, B.S. – Simova-Stoilova, L.P. – Demirevska, K.M. – Feller, U.: Abscisic acid and late embryogenesis abundant protein profile changes in winter wheat under progressive drought stress. *Plant Biology* 12, 2010: 698-707
- Vašková, M.: Stabilní izotopy uhlíku a kyslíku jako markery fyziologické odezvy na měnící se podmínky prostředí. In: *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2009*, Bláha, L. – Hnilička, F. – Martinková, J., Eds. VÚRV.v.v.i. & ČZU v Praze, 2009: 67-71
- Vannini, C. – Locatelli, F. – Bracale, M. – Magnani, E. – Marsoni, M. – Osnato, M. – Mattana, M. – Baldoni, E. – Coraggio, I.: Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*. 37, 2004: 115-127
- Vítámvás, P. – Kosová, K. – Prášil, I. T.: Proteome and protein analysis in plant stress research. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 43, 2007: 1-6
- Vítámvás, P. – Kosová, K. – Škodáček, Z. – Prášil, I.T.: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy* 104, 2010: 671-676
- Vítámvás, P. – Prášil, I.T. – Kosová, K. – Planchon, S. – Renaut, J.: Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A a 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics* 12, 2012: 68-85

- Vítámvás, P. – Saalbach, G. – Prášil, I.T. – Čapková, V. – Opatrná, J. – Ahmed, J.: WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter sheat. *Journal of Plant Physiology* 164, 2007: 1197-1207
- Wan, J. – Griffiths, R. – Ying, J. – McCourt, P. – Huang, Y.: Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses. *Crop Science* 49, 2008: 1539-1554
- Wang, W. – Scali, M. – Vignani, R. – Spadafora, A. – Sensi, E. – Mazzuca, S. – Cresti, M.: Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24, 2003: 2369-2375
- Weiser, J. – Holub, M. – Nezbedová, Š. – Bezoušková, S.: Proteomika jako komplexní přístup ke studiu fyziologických regulací u bakterií. *Chemické listy* 99, 2005: 890-895
- Wise, M. J. – A. Tunnacliffe: POPP the question: What do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9, 2004: 13-17
- Wu, Y. – Cosgrove, D.J.: Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, 51, 2000: 1543-1553
- Xu, S.: Abscisic acid activates a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-stimulated protein kinase involved in antioxidant defence in maize leaves. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 42, 2010: 646-655
- Xue, Y. – Peng, R. – Xiong, A. – Li, X. – Zha, D. – Yao, Q.: Yeast heat-shock protein gene *HSP26* enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 166, 2009: 844-850
- Yamaguchi-Schinozaki, K. – Schinozaki, K.: A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *The Plant Cell* 6, 1994: 251-264

Yamaguchi-Schinozaki, K., Shinozaki, K.: Organization of cis-acting regulation elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10, 2005: 88-94

Yamaguchi-Schinozaki, K., Shinozaki, K.: *Annual Review of Plant Biology* 57, 2006: 781-803

Yin P. – Fan, H. – Hao, Q. – Yuan, X. – Wu, D. – Pang, Y. – Yan, Ch. – Li, W. – Wang, J. – Yan, N.: Structural insights into the mechanism of abscisic acid signalling by PYL proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 2009: 1230-1236.

Zhu, B. – Choi, D.-W. – Fenton, R. – Close, T.J.: Expression of the barley dehydrin multigene family and the devoleplnet of freezing tolerance. *Molecular and General Genetics* 264, 2000:145-153

Zhu ,S.-Y. – Yu, X.-Ch., – Wang, X.-J. – Zhao, R. – Li, Y.: Two calcium-dependent protein kinases, CPK<sub>4</sub> and CPK<sub>11</sub>, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*[W]. *The Plant Cell* 19, 2007: 3019-3036.

## 11 PŘÍLOHY

### 11.1 Příloha č. 1

#### **Přístroje:**

Chlazená vertikální elektroforéza (MultiGel-Long od firmy Biometra)

Zařízení pro blotování umožňující přenos proteinů z gelu na membránu (Fast-Blot od firmy Biometra)

Zdroj stejnosměrného proudu pro elektroforézu a blotovací systém (P30 od firmy Biometra)

Chlazená centrifuga s rotorem a adaptory pro centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml (boil proof) a 15 ml

Skener pro převedení signálu na membráně do elektronické formy

Software na vyhodnocení density signálu (QuantityOne od firmy Bio-Rad)

pH metr

Laboratorní magnetické míchadlo

Analytické váhy

Laboratorní předvážky

Třepačka na gely a membrány- nejlépe s pomalým, kývavým pohybem

Třepačka Vortex

Lednice

Mrazák (stačí -20 °C, pro dlouhodobější skladování vzorků je doporučen hubokomrazicí, tj. -70 °C)

Laboratorní digestoř

Termoblok vyhříváný na min. 95 °C na centrifugační mikrozukmavky (1,5 ml)

Vařič

#### **Chemikálie**

Všechny chemikálie by měly mít min. čistotu „analytical reagent“ (p.a.)

Acrylamide/Bis Solution, 30%, 37,5:1 (Bio-Rad)

Immun-Blot Assay Kit, GAR-AP conjugate, with BCIP/NBT (Bio-Rad)

Anti-dehydrin polyklonální protilátku vázající se na K-segment (Stressgen)

EDTA\_free protease inhibitor cocktail tablets (Roche)

Aceton

Glycin

Glycerol

Metanol

Etanol

Dodecylsulfát sodný (SDS)

Kyselina chlorovodíková (HCl)

Tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris)

2-merkapt ethanol

NNN'N' – tetramethylendiamin (TEMED)

Persíran amonný (APS)

Bromfenolová modř

#### **Spotřební materiál, laboratorní pomůcky:**

Nitrocelulosaová membrána (póry 0,45 μm), kádinky, odměrné válce, petriho misky na promývání gelů a membrán, 1,5 ml plastové centrifugační zkumavky a 15 ml, keramické třecí misky a tloučky, automatické pipety a špičky na pipety, pinzety, nůžky, blotovací filtrační papír (QuickDraw (Sigma)), osobní ochranné pracovní prostředky (rukavice)

**Roztoky**

Vždy používat co nejčistší vodu (miliQ, redestilovaná, nebo deionizovaná) při přípravě roztoků.

- A) zásobní extrakční pufr (1 M Tris-HCl, pH 8,5):**  
rozpustit 12,1 g Tris v 75 ml H<sub>2</sub>O, pomocí pH metru a koncentrované HCl upravit pH roztoku na 8,5. Doplnit vodou na 100 ml a doměřit pH na 8,5. Může se skladovat v lednici.
- B) Extrakční pufr (100 mM Tris-HCl, pH 8,5 s inhibitorem proteáz):**  
5 ml roztoku **A** doplnit vodou do 50 ml a přidat 1 tabletu inhibitoru proteáz (EDTA\_free protease inhibitor cocktail tablets (Roche)). Rozpustit protřepáním (votrex) a použít na extrakce rozpustných proteinů.
- C) Aceton s 1 % (v/v) 2-merkaptioethanolem:**  
1 ml 2-merkaptioethanolu doplnit acetonem do 100 ml. Vychladit v mrazáku (-20 °C) před použitím.
- D) Zásobní pufr na dělicí gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8):**  
18,2 g Tris rozpustit v 75 ml vody, koncentrovanou HCl upravit na pH 8,8. Doplnit vodou na 100 ml a doměřit pH roztoku na 8,8. Skladovat v lednici.
- E) Zásobní pufr na zaostřovací gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8):**  
6,06 g Tris rozpustit v 75 ml vody, koncentrovanou HCl upravit na pH 6,8. Doplnit vodou na 100 ml a doměřit pH roztoku na 6,8. Skladovat v lednici.
- F) 10 % APS (w/v):**  
200 mg APS doplnit vodou na 2 ml, roztok připravovat vždy čerstvý.
- G) 10 % SDS (w/v):**  
5 g SDS doplnit vodou na 50 ml, skladovat při pokojové teplotě.
- H) Elektrodotový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 3,5 mM SDS):**  
Nejdříve se připraví zásobní elektrodotový pufr: 33,3 g Tris se rozpustí v 700 ml vody a poté se přisype 144 g glycinu. Po rozmíchání doplnit vodou na 1 l. Skladovat v lednici. 1 g SDS se rozpustí v 500 ml vody, k tomu se přidá 100 ml zásobního elektrodotového pufru a doplní do 1 l.
- I) Blotovací pufr ((48 mM Tris, 39 mM glycin, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) metanol):**  
5,8 g Tris, 2,9 g glycinu a 375 mg SDS se rozpustí v 500 ml vody. Přidá se 200 ml metanolu a doplní do 1 L.
- J) Vzorkový pufr ((60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 5% (v/v) 2- merkaptioethanol):**  
Nejdříve s připraví zásobní vzorkový pufr: 1,2 ml roztoku **E** se promíchá s 5,3 ml vody. Přidá se 1 ml glycerolu, 2 ml roztoku **G** a špetka bromfenolové modři. Skladovat v lednici.  
V digestoři se k 475 µl zásobního roztoku se přidá 25 µl 2-merkaptioethanolu a promíchá.
- K) TBS pufr (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5):**  
Pro co nejmenší variabilitu výsledků se doporučuje používat „Immun-Blot Assay Kit, GAR-AP conjugate, with BCIP/NBT (Bio-Rad)“ jehož součástí je již předmíchaný 10 krát koncentrovaný TBS (10x TBS; 200 mM Tris, 5 M NaCl, pH 7,5). Pak tedy 100 ml 10x TBS doplní vodou do 1 L.
- L) TTBS pufr ((20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,5):**  
Přidat 350 µl Tweenu-20 do 700 ml roztoku **K**.
- M) Blokovací roztok ((4 % netučné sušené mléko (w/v) v TBS)):**

Přidat 4 g sušeného mléka do 100 ml roztoku **K**, rozmíchat. Lze použít i želatinu (3 %) – ale pak se musí zahřívát a v chladnu (lednici) tuhne. BSA nepoužívat – polyklonální anti-dehydrin protilátka se váže také na BSA.

**N) Protilátkový pufr (1,5% netučné sušené mléko (w/v) v TTBS):**

3 g sušeného mléka přidat do 200 ml roztoku **L**, rozmíchat. Pokud se používá želatina, tak se použijí jen 2 g na 200 ml TTBS.

**O) Pufr s primární protilátkou:**

Přidat 25  $\mu$ l anti-dehydrin protilátky do 25 ml roztoku **N**. 25 ml stačí na jednu membránu (11 x10 cm), lze opakovaně použít (3-4 krát) pokud se uschová po použití v min. -20 °C.

**P) Pufr se sekundární protilátkou:**

Přidat 16,5  $\mu$ l sekundární protilátky s konjugovanou alkalickou fosfatázou (AP) do 50 ml roztoku **N**. Sekundární protilátka se nachází v kitu „Immun-Blot Assay Kit, GAR-AP conjugate, with BCIP/NBT (Bio-Rad)“.

**Q) Barvu vyvíjející roztok:**

V kitu „Immun-Blot Assay Kit, GAR-AP conjugate, with BCIP/NBT (Bio-Rad)“ se nachází 25x koncentrovaný AP Color development buffer, dále AP color reagent A (obsahuje NTB) a AP color reagent B (obsahuje BCIP). Z 25x koncentrátu se odeberou 2 ml a smíchají se s 48 ml vody. K tomuto roztoku se přidá 500  $\mu$ l AP color reagent A a 500  $\mu$ l AP color reagent B. Vždy připravovat čerstvý roztok, chránit před světlem.

## **11.2 Příloha č. 2**

### **SDS pufr**

30% sacharosa  
2% SDS  
0,1 M Tris-HCl – pH 8  
5% 2-merkaptoetanol

### **Lyzační pufr (rozpuštění proteinů)**

30 mM TRIS  
7 M UREA  
2 M THIOUREA  
4 % (w/v) CHAPS  
Upravit pH na 8,5 pomocí HCl  
Uchovávat v mrazáku.

### **Rehydratační pufr (rehydratace IPG stripů)**

8 M UREA  
2% (w/v) CHAPS  
50 mM DTT (dithiotreitol)  
Uchovávat v mrazáku.

### **Elektroforéza**

**Ekvilibrační pufr – 30 ml DTT/6 stripů, 30 ml jodacetamid/6 stripů**

#### **DTT**

6 M UREA  
0,375 M TRIS-HCl, pH 8,8  
2% (w/v) SDS  
20% glycerol  
2% (w/v) DTT (600 mg)

#### **Jodacetamid**

6 M UREA  
0,375 M TRIS-HCl, pH 8,8  
2% (w/v) SDS  
20% glycerol  
2,5 (w/v) jodacetamid (750 mg)

### **12,5% akrylamidový gel – 600 ml/6 gelů**

250 ml 30% AA  
150 ml 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8  
6 ml 10 % SDS  
6 ml 10 % APS  
0,83 ml 10 % TEMED  
187 ml voda

### **Water-saturated butanol**

### **Running pufr**

10x TRIS glycinový pufr (30,3 g TRIS, 144 g glycin, 1 l voda)

**1x anodový pufr - 4,5 l**

0,45 l 10x TRIS

4,05 l voda

4,5 g SDS

**3x katodový pufr – 1,2 l**

0,36 l 10x TRIS

0,84 l voda

3,6 g SDS

**Agarosový gel – 25 ml**

25 mM TRIS

192 mM glycin

0,1% (w/v) SDS

0,5% (w/v) low melting agarosa

Bromfenolová modř

**5% roztok kyseliny octové**



### 11.3 Příloha č. 3

Výčet proteinových spotů v jednotlivých shlucích včetně molekulové hmotnosti (Mr) a izoelektrického bodu (pI)

Shluk č. 1			Shluk č. 2			Shluk č. 3			Shluk č. 4		
číslo spotu	Mr (KDa)	pI	číslo spotu	Mr (KDa)	pI	číslo spotu	Mr (KDa)	pI	číslo spotu	Mr (KDa)	pI
4	19,17	5,01	11	19,65	5,23	205	33,33		805	69,11	5,2
4009	21,69	6,22	1001	13,09	5,31	8202	37,52	7,13	3804	69,32	5,89
8806	70	7,42	3008	24	6,09	2106	28,47	5,66	7301	44,07	6,79
8808	69,72	7,45	7520	53,07	7,06	3116	27,53	6,11	8708	63,62	7,24
17	20,1	5,09	8803	70,83	7,34	408	48,64	5,25	8801	69,43	7,08
8113	30,5	7,48	1104	26,49	5,34	7403	48,4	6,82	2702	64,06	5,6
5701	66,08	6,35	5202	33,6	6,4	8607	58,98	7,41	8701	65,64	7,15
8106	31,19	7,27	12	12,64	5,26	9009	22,54	7,91	2813	74,86	5,71
7001	19,2	6,85	1213	38,62	5,55	2111	31,03	5,73			
8006	22,51	7,28	3401	51,26	5,83	4611	56,65	6,24			
8104	31,5	7,2	4109	31,55	6,15	5821	75,31	6,48			
8110	31,04	7,33	8411	50,06	7,38	8201	38,97	7,1			
7006	18,74	6,99	118	26,66	5,25	2107	30,61	5,67			
8103	31,62	7,14	2303	40,89	5,65	7106	29,99	6,89			
114	25,61	5,22	8217	35,31	7,45	6513	51,51	6,77			
6813	70,68	6,73	3306	40,81	5,91	2004	16,25	5,68			
8809	69,44	7,49	7421	48,68	7,05	6108	26,09	6,64			
9801	69,42	7,51	8403	49,82	7,11	7109	26,99	6,95			
4614	56,62	6,31	1303	43,83	5,31	6402	48,13	6,57			
119	24,48	5,28	1310	44,71	5,52	9006	17,59	7,7			
4303	41,71	6,18	3114	29,45	6,07	401	45,73				
4708	66,43	6,24	112	31,55	5,15	1119	26,45	5,51			
803	80	5	1212	36,97	5,53	2104	26,9	5,61			
7802	70,46	6,82	4812	69,78	6,25	9004	17,33	7,6			
1403	48,59	5,34	1712	63,68	5,44	7005	12,01	6,95			
			3409	51,24	5,94	1007	15,66	5,43			
			8709	65,28	7,24	2108	29,7	5,69			
			2304	44,61	5,66	3104	24,38	5,84			
			3315	42,69	6,03	7110	25,1	6,96			
			3103	31,52	5,84						
			906	83,6	5,19						
			4501	51,98	6,12						
			1905	90,34	5,54						
			3107	29,05	5,91						
			7502	53,6	6,79						
			3810	80,44	5,92						

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

			<b>7702</b>	67,09	6,86						
			<b>8007</b>	12,94	7,28						
			<b>3006</b>	19,64	6,08						
			<b>8001</b>	23,64	7,08						
			<b>4007</b>	23,64	6,18						
			<b>4507</b>	51,91	6,34						
			<b>4201</b>	33,74	6,15						
			<b>4203</b>	32,78	6,2						

### 11.4 Příloha č. 4

Poměry abundancí 106 vybraných proteinových spotů, včetně vyznačení statistické signifikance odlišnosti akumulace proteinů za pomoci t-testu.

číslo spotu	S vs. K		Ex S vs. K		Ex S vs. S	
		t test		t test		t test
4	1,4954	0,4263	2,0821	0,0414	1,3923	0,3467
11	-2,1212	0,0021	-1,9505	0,0625	1,0875	0,8313
12	-2,4156	0,0102	-1,6657	0,0258	1,4502	0,0672
17					1,6788	0,1355
112	1,5194	0,1529	-1,2301	0,5365	-1,8690	0,0085
114	1,8451	0,1219	2,6547	0,0104	1,4388	0,1133
118	-2,2728	0,0171	-1,6336	0,0736	1,3913	0,3883
119	-1,5714	0,4802	2,0762	0,0993	3,2626	0,0166
205	4,0759	0,0036	-1,2325	0,7362	-5,0235	0,0020
401	-1,4748	0,0413	1,5150	0,0862	2,2343	0,0223
408	2,3198	0,0662	2,0676	0,0102	-1,1220	0,6166
803					1,1411	0,3288
805	-3,3989	0,0014	-3,7280	0,0001	-1,0968	0,7331
906	-2,4408	0,0037	-2,1424	0,0034	1,1393	0,5113
1001	-2,4057	0,0166	-2,4472	0,0178	-1,0172	0,8266
1007	2,8080	0,1165	-1,2197	0,7020	-3,4249	0,0885
1104	-3,0623	0,0201	-2,9118	0,0117	1,0517	0,8100
1119	1,9368	0,0940	2,0334	0,0636	1,0498	0,7326
1212	1,1123	0,5485	-1,8585	0,0376	-2,0672	0,0329
1213	-2,2356	0,0181	-2,4925	0,0217	-1,1149	0,5688
1303	-1,8485	0,0704	-3,1034	0,0283	-1,6788	0,0702
1310	-1,2169	0,4099	-2,0693	0,0373	-1,7004	0,1301
1403	3,8948	0,0296	4,4794	0,0032	1,1501	0,5119
1712	-1,4392	0,1146	-1,7938	0,0651	-1,2464	0,1505
1905	-2,0914	0,0877	-2,0394	0,0897	1,0255	0,8416
2004	2,5859	0,0676	1,1426	0,6104	-2,2631	0,0575
2104	-2,0959	0,0373	-1,7231	0,0894	1,2163	0,5774
2106	2,8237	0,0612	-1,1497	0,8343	-3,2464	0,0396
2107	3,6204	0,0043	3,8665	0,0258	1,0680	0,7733
2108	2,3652	0,0591	1,1780	0,7090	-2,0079	0,0066
2111	1,6391	0,0249	2,2433	0,0203	1,3686	0,1435
2303	-2,0596	0,0420	-2,0152	0,0384	1,0220	0,9448
2304	-1,3232	0,2109	-3,4841	0,0056	-2,6330	0,0382
2702	-1,2397	0,2070	-2,5637	0,0151	-2,0680	0,0532
2813	-6,2160	0,0005	-5,1782	0,0002	1,2004	0,6587
3006	-2,9580	0,0037	-4,3714	0,0012	-1,4778	0,3056
3008	-1,8962	0,0403	-2,0040	0,0289	-1,0569	0,6613
3103	-1,2296	0,3328	-3,7516	0,0158	-3,0511	0,0065

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

3104	4,3903	0,0008	2,9273	0,0043	-1,4998	0,0093
3107	-3,2280	0,0115	-2,3801	0,0077	1,3563	0,3637
3114	-1,3152	0,2323	-2,0785	0,0417	-1,5804	0,1204
3116	2,6808	0,0340	1,4772	0,3273	-1,8148	0,0833
3306	-2,5254	0,0330	-2,1324	0,0426	1,1843	0,2488
3315	-1,0919	0,7052	-4,1619	0,0070	-3,8117	0,0489
3401	-2,1580	0,0710	-2,4432	0,0699	-1,1322	0,7026
3409	-1,2305	0,2103	-2,0691	0,0238	-1,6815	0,0277
3804	-2,1271	0,0223	-1,8420	0,0040	1,1548	0,5795
3810	-2,0738	0,0248	-1,6718	0,0428	1,2405	0,3426
4007	-9,2465	0,0011	-16,6885	0,0015	-1,8048	0,1630
4009	1,8074	0,0108	2,4499	0,0005	1,3555	0,0197
4109	-2,4507	0,0200	-2,0986	0,0358	1,1678	0,7415
4201						
4203	-4,0661	0,0088	-7,8742	0,0110	-1,9365	0,2990
4303	1,0618	0,8864	2,4332	0,0256	2,2915	0,0107
4501	-2,2024	0,0508	-2,7974	0,0221	-1,2702	0,2315
4507	-3,8173	0,0405				
4611	1,6317	0,1086	2,1501	0,0341	1,3177	0,2003
4614	2,3830	0,0017	4,7986	0,0017	2,0136	0,0093
4708	-1,6478	0,1454	2,0737	0,0128	3,4170	0,0044
4812	1,1035	0,4736	-1,8401	0,0444	-2,0307	0,0002
5202	-2,7888	0,0157	-2,5321	0,0099	1,1014	0,3488
5701	1,8830	0,1829	5,4713	0,0010	2,9057	0,0007
5821	1,5411	0,1182	2,2263	0,0038	1,4447	0,0690
6108	2,3893	0,0514	1,1451	0,4514	-2,0866	0,0801
6402	2,3998	0,0199	1,5012	0,3907	-1,5986	0,1415
6513	2,3741	0,0213	2,1160	0,0333	-1,1220	0,4542
6813	1,6820	0,0421	2,3740	0,0030	1,4114	0,0534
7001					2,4062	0,0039
7005	-2,0867	0,0011	1,0573	0,3420	2,2062	0,0001
7006	2,5957	0,1026	11,7323	0,0003	4,5199	0,0009
7106	2,6867	0,0514	2,9693	0,0032	1,1052	0,6253
7109	3,9841	0,0028	1,9206	0,3399	-2,0745	0,0739
7110	4,0952	0,0111	2,1809	0,0718	-1,8778	0,0415
7301	-2,2334	0,0103	-1,9301	0,0126	1,1571	0,4822
7403	2,1985	0,0243	2,4208	0,0444	1,1011	0,6807
7421	-1,7747	0,1312	-2,0256	0,1119	-1,1414	0,5855
7502	-3,2886	0,0134	-2,4384	0,0115	1,3487	0,2083
7520	-2,2557	0,0195	-1,9435	0,0271	1,1607	0,5373
7702	-2,7477	0,0103	-1,7943	0,0182	1,5313	0,0760
7802					1,8768	0,0011
8001	-2,9919	0,0000	-8,2598	0,0000	-2,7607	0,0009
8006					3,2549	0,0068
8007	-2,5953	0,0345	-1,4147	0,0016	1,8345	0,1159

## Studium proteinových markerů suchovzdornosti ječmene pomocí současných metod proteomiky

8103					7,7949	0,0031
8104	5,4331	0,0200	14,7108	0,0003	2,7077	0,0003
8106	-1,0083	0,9901	4,3837	0,0011	4,4202	0,0122
8110					4,8647	0,0036
8113					1,6978	0,1580
8201	1,6968	0,0473	2,1520	0,0157	1,2682	0,2067
8202	5,5437	0,0132	1,3897	0,4576	-3,9892	0,0115
8217	-2,2048	0,0255	-1,8091	0,0308	1,2187	0,4597
8403	-1,7148	0,0122	-2,0753	0,0357	-1,2103	0,5631
8411	-2,1547	0,0020	-1,9425	0,0011	1,1092	0,4534
8607	2,1566	0,0163	2,7660	0,0004	1,2826	0,0873
8701	-2,0533	0,0083	-2,6875	0,0018	-1,3089	0,3054
8708	-2,4619	0,0145	-2,0527	0,0087	1,1994	0,5713
8709	-1,1662	0,5849	-2,1548	0,0426	-1,8478	0,1590
8801	-2,0966	0,0110	-2,4126	0,0061	-1,1507	0,5426
8803	-2,0505	0,0750	-2,4967	0,0512	-1,2176	0,2819
8806	2,0388	0,1461	3,1893	0,0065	1,5643	0,1130
8808	1,1624	0,6818	3,3553	0,0372	2,8866	0,0401
8809	1,9237	0,0736	2,7220	0,0007	1,4150	0,0764
9004	-1,5385	0,0249	-2,4273	0,0033	-1,5776	0,0521
9006	6,8138	0,0003	5,9392	0,0351	-1,1473	0,5839
9009	2,8482	0,0784	3,3587	0,0172	1,1793	0,5561
9801	1,2731	0,1387	2,0278	0,0277	1,5928	0,0621

	S vs. K		Ex S vs. K		Ex S vs. S	
		t-test		t-test		t-test
<b>celkem</b>	62	48	68	61	30	25
<b>zvýšená akumulace&gt;2</b>	25	15	32	29	15	15
<b>snížená akumulace&gt;2</b>	37	33	36	32	15	10

>2.0
<-2.0
t-test <0.05