

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv solného stresu na fenotyp a kořenový proteom
ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Dominika Czerná
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

„Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Pavlovi Vadovičovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce. Velké díky patří také Ing. Tomáši Takáčovi, Ph.D. za jeho ochotu a pomoc při práci v laboratoři a při vyhodnocování výsledků. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. a celému Oddělení buněčné biologie (CRH) za vytvoření příjemné atmosféry při realizaci této práce.“

Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA PřF2015_015.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Dominika Czerná
Název práce	Vliv solného stresu na fenotyp a kořenový proteom ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i>) cv. Golden Promise
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Značné množství zemědělské půdy trpí na zvýšenou koncentraci soli, což se odráží na celkovém výnosu pěstovaných plodin. Z toho důvodu se mnoho výzkumných projektů snaží přispět k vyšlechtění nových, soli odolných rostlinných kultur. Šlechtění předchází experimenty s plodinami tolerantními na sůl. Při těchto experimentech se hodnotí řada faktorů - mezi nimi taky fenotyp plodin a změny celkového proteinového složení po působení solného stresu na rostliny. Teoretická část práce pojednává o signálních mitogen aktivovaných protein kinasových drahách rostlin, obecně se zabývá reakcí rostlin na stresové podmínky a konkrétně se zaměřuje na solný stres. Také se v této části objevuje úsek věnovaný proteomickému přístupu. Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na sledování fenotypových změn a variací zaznamenaných v kořenovém proteomu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise po působení solného stresu. Fenotypové změny v kořenovém systému byly vyjádřeny rozdílnými délkami a počtem kořenů na rostlinu u stresovaných i kontrolních rostlin. Změny v nadzemní části byly vyhodnoceny prostřednictvím spektrofotometrického stanovení listových barviv. Změny v kořenovém proteomu ječmene setého byly detekovány pomocí dvourozměrné elektroforézy. Fenotypové a proteomické výsledky byly ve vzájemném souladu. Pozorování inhibice růstu kořenového systému u stresovaných rostlin se shodovalo s předpokládaným vyšším výskytem katabolických reakcí u stresovaných rostlin oproti kontrolním rostlinám.

Klíčová slova dvourozměrná elektroforéza, ječmen setý (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise, mitogen aktivované protein kinasy, proteomika, solný stres

Počet stran 44

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Dominika Czerná
Title	Phenotypic and root proteome changes of barley (<i>Hordeum vulgare</i>) cv. Golden Promise grown under salt stress conditions
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

A substantial amount of agricultural land is suffering from increased salt concentration and this fact is reflected in the decreased yield of crops. To cope with this problem, there is a big effort to breed new salt resistant plant cultures. At the beginning of producing new plant resistant cultures, experiments that comprise testing plant salt tolerance are inevitable. This experiments include monitoring crop phenotypes under the salt stress and analyzing changes in the total protein composition of crop plants after salt stress. Theoretical part of the thesis summarizes knowledge about the mitogen activated protein kinases pathways of crops. It also deals with reactions of crops under stress conditions with the focus on salt stress. One section of the thesis is devoted to proteomics approach. Practical part of the bachelor thesis is focused on monitoring and analyzing phenotype changes observed on the barley plants (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise root proteome. The phenotypic changes in the root system were evaluated as differences in the number of roots per plant in stressed and control plants. Green part of analyzed plants was evaluated for leaf pigments by spectrophotometric measurement. Changes in the root proteome of barely stressed and control plants were detected by two-dimensional electrophoresis. Results of phenotypic and proteomic analyses were in accordance when observed retarded growth of root system of stressed plants was confirmed by the hypothesis of proteomic analyses.

Keywords	Two-dimensional electrophoresis, barley (<i>Hordeum vulgare</i>) cv. Golden Promise, mitogen activated protein kinase, proteomics, salt stress
----------	--

Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Jednoděložné rostliny (<i>Liliopsida, Monocotyledonae</i>)	2
2.1.1 Rod: Ječmen (<i>Hordeum</i>)	2
2.2 Charakteristika MAP kinas u rostlin	3
2.2.1 MAPK signalizační dráhy	3
2.2.1.1 Aktivace MAPK kaskády.....	3
2.2.1.2 Deaktivace MAPK kaskády	5
2.2.2 MAPK kinasy jednoděložných rostlin	5
2.2.2.1 MAPK kinasy rýže	5
2.2.2.2 MAPK kinasy ječmene	6
2.3 Vnímání stresových podmínek u rostlin	6
2.3.1 Solný stres (Osmotický stres)	7
2.4 Proteomika	8
2.4.1 Aplikace proteomiky v praxi.....	9
2.4.2 Proteomická analýza	9
2.4.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE).....	10
2.4.2.1.1 Příprava vzorku pro 2-DE	11
2.4.2.1.2 Isoelektrická fokusace (IEF)	11
2.4.2.1.3 Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	12
2.4.2.1.4 Vizualizace proteinových skvrn	13
2.4.2.1.5 Vyhodnocení proteinových skvrn na gelu.....	14
2.4.2.1.5.1 PDQuest	14
2.4.2.1.6 Nevýhody 2-DE	15
2.4.2.2 Identifikace proteinů	16

2.4.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)	16
3 Experimentální část	17
3.1 Materiál	17
3.1.1 Chemikálie	17
3.1.2 Přístroje	17
3.1.3 Rostlinný materiál	18
3.2 Metody	18
3.2.1 Sterilizace a příprava rostlinného materiálu pro pěstování	18
3.2.2 Pěstování ječmene	18
3.2.3 Sklizení ječmene a fenotypizace kořenového systému	20
3.2.4 Příprava rostlinného homogenátu	20
3.2.5 Lyofilizace listového homogenátu	20
3.2.6 Měření koncentrace listových barviv	20
3.2.7 Extrakce proteinů z kořenového systému	21
3.2.8 Precipitace a čištění vyextrahovaných proteinů	21
3.2.9 Rozpouštění proteinového peletu a měření koncentrace vzorků	22
3.2.10 Dvourozměrná elektroforéza (2-DE)	22
3.2.10.1 Isoelektrická fokusace proteinů	22
3.2.10.2 Úprava proteinů rozdělených na 7 cm IPG stripech	23
3.2.10.3 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS–PAGE)	23
3.2.10.4 Barvení gelů a kvantifikace denzity skvrn	23
4 Výsledky a diskuze	24
4.1 Fenotypizace	24
4.1.1 Kořenové fenotypové změny u ječmene setého po aplikaci soli	24
4.1.2 Fenotypová změna u listů ječmene setého po solném stresu	26
4.1.3 Rozdíl v čerstvé hmotnosti u ječmene setého po aplikaci solného stresu	28

4.2 Dvourozměrná elektroforetická analýza proteinů z kořenů ječmene setého po solném stresu.....	29
4.2.1 Optimalizace rozpouštění proteinového peletu.....	29
4.2.2 Proteomická analýza	30
5 Závěr	36
6 Literatura	38
7 Seznam použitých zkratek.....	44

Cíle práce

Teoretická část

- Vypracování literární rešerše na téma mitogen aktivované protein kinasy (MAPK) zacílené na MAPK jednoděložných rostlin.
- Sumarizace dosavadních poznatků o rostlinném stresu se zaměřením na osmotický stres.
- Shrnutí možností proteomické analýzy.

Praktická část

- Pěstování ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise v hydroponických podmínkách solného stresu.
- Vyhodnocení fenotypových změn po působení solného stresu u *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise.
- Příprava a vyhodnocení dvourozměrných gelů z proteinových vzorků kořenového systému ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise v solných i kontrolních podmínkách.

1 Úvod

V dnešní době více než 800 miliónů hektarů půdy obsahuje zvýšené množství soli. Tento fakt hraje velkou roli v pěstování zemědělských plodin (Zhu, 2001; Munns, 2005). Důkladné pochopení a prostudování mechanismů obrany rostlin při osmotických stresových podmínkách může vést ke zlepšení pěstitelských praktik a k rozvoji plodin odolných nebo tolerantních vůči soli (Munns a Tester, 2008). Osmotický stres je vytvořen nadměrným množstvím soli v půdě, zejména NaCl. Primárně je nejdříve zasažen kořen, ve kterém adaptační reakce probíhají mnohokrát rychleji než v ostatních orgánech. Proteomické experimenty kořenového systému nám poskytují nové poznatky o kořenových reakcích a adaptacích na stresové podmínky (Ghosh a Xu, 2014).

Rostliny řadíme mezi trvalé (stabilní) organismy, které na rozdíl od zvířat nemohou uniknout nepříznivým podmínkám, proto musí nepřetržitě bojovat se změnami vnějšího prostředí (Smékalová *et al.*, 2014). Bylo prokázáno, že některé proteiny podílející se na vnímání signálů, jsou již v raných stádiích osmotického stresu v mnohonásobné převaze než u rostlin, které osmotickým stresem netrpí (Zhao *et al.*, 2013). Při experimentech směřujících k hlubšímu pochopení přenosu signálu v buňce bylo zjištěno, že reverzibilní fosforylace proteinů hraje klíčovou roli při odpovědi rostlin na extracelulární podnět (Somssich, 1997). Mezi hlavní přenašeče signálů v eukaryotické buňce řadíme mitogen aktivované protein kinasy. Jedná se o komplexní multienzymatické dráhy, které hrají významnou roli při odpovědi a adaptaci rostlin na stresové podmínky (Colcombet a Hirt, 2008).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Jednoděložné rostliny (*Liliopsida, Monocotyledonae*)

Krytosemenné rostliny (angiospermické), řazené do velké skupiny vyšších rostlin, mají pouze jedno oddělení – *Magnoliophyta*. Představují v dnešní době nejrozšířenější skupinu rostlin a jsou rozdělovány do třech tříd: *Magnoliopsida* (nižší dvouděložné rostliny), *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny) a *Liliopsida* (jednoděložné rostliny). Jednoděložné rostliny označujeme za monokotylní (s jednou dělohou) rostlinnou skupinu, vyvinutou z primitivních magnoliopsid. Mezi typické znaky této třídy řadíme: ataktostéličskou stavbu stonku, který druhotně netloustne, zárodek má pouze jednu dělohu, hlavní kořen brzy zaniká a je nahrazen postranními svazčitými kořeny. Květy mohou být jednopohlavné či dvoupohlavné, spirocyklické až cyklické. Květní obal nebývá často rozlišen a obsahuje trojčetné kruhy květních orgánů. Tato třída čítá asi 20 řádů (Kalina a Slavíková, 2003).

2.1.1 Rod: Ječmen (*Hordeum*)

Archeologické důkazy naznačují, že ječmen byl domestikován před 10 000 lety v oblasti úrodného púlměsíce (dnešní území Iráku, Izraele, Jordánska, Libanonu a Sýrie). Je řazen mezi obiloviny a ve světové produkci zaujímá čtvrtou pozici (Zohary a Hopf, 2000). Ječmen patří do třídy jednoděložných rostlin, řádu Lipnicotvarých (*Poales*) a čeledi Lipnicovitých (*Poaceae*) (Gaut, 2002; Kalina a Slavíková, 2003). Jedná se o jednoletou či víceletou plodinu. Plodem je obilka a květenství má uspořádané do klasu (Holubová, 1989). Genom ječmene čítá velikost 4,9 až 5,3 x 10⁹ párů bazí (Kleinhofs a Graner 2001).

Primárně se tato obilovina pěstuje jako krmivo pro dobytek a je základem sladovnického průmyslu. Díky mnohaletému výzkumu ve sladovnictví je ječmen považován za modelovou rostlinu pro proces klíčení (hormonální signalizace při klíčení v aleuronové vrstvě) (Finnie a Svensson, 2009). V některých oblastech světa je ječmen důležitým zdrojem lidské výživy (Schulte *et al.*, 2009). Velký význam hraje také jeho vysoká toleranční schopnost vůči soli, která se uplatňuje především v hospodářství (Maas a Hoffman, 1977). Do rodu ječmene řadíme více než 30 druhů planého ječmene a jeden druh kulturní, jehož zástupcem je ječmen setý (*Hordeum vulgare*) (Holubová, 1989). Ječmen setý je v České republice druhou nejpěstovanější obilninou (Dreiseitl, 2003).

2.2 Charakteristika MAP kinas u rostlin

2.2.1 MAPK signalizační dráhy

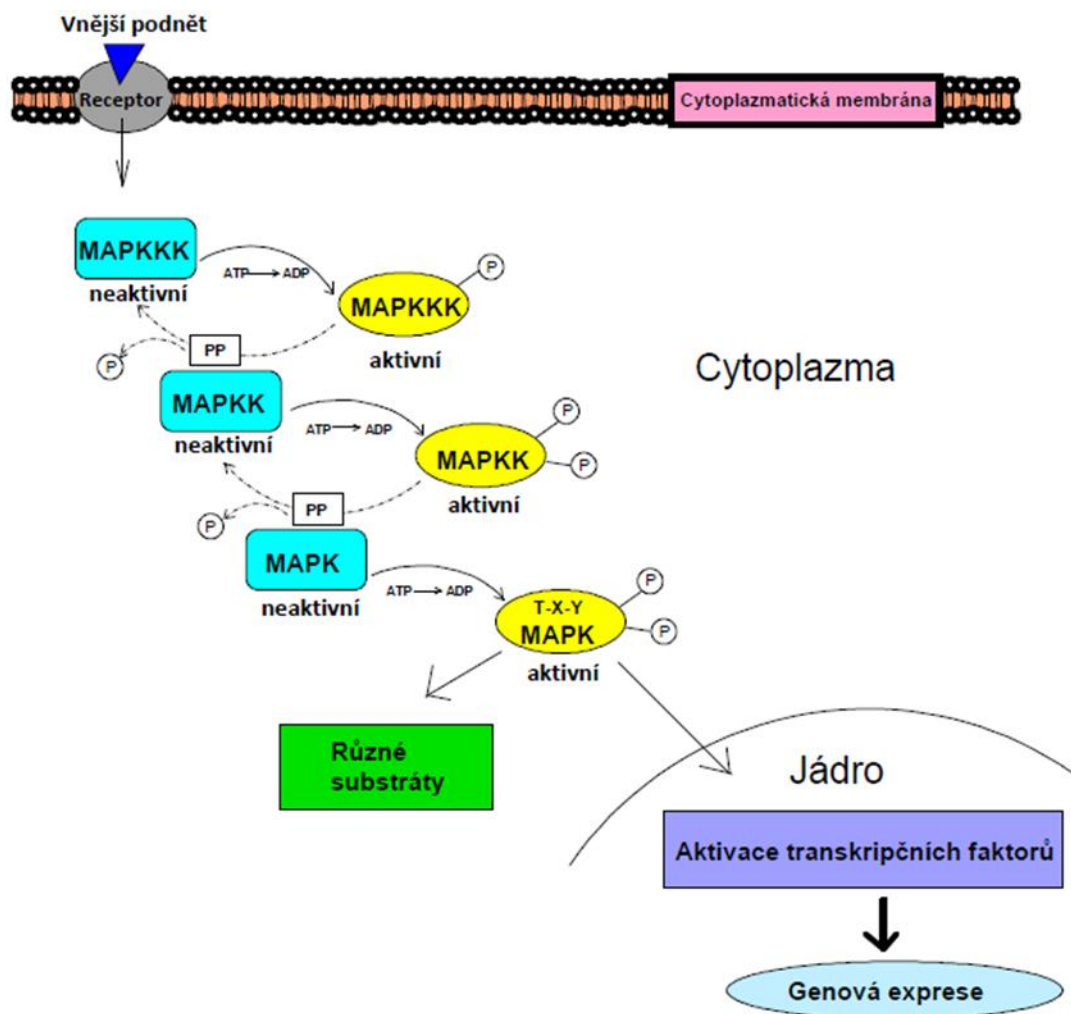
Eukaryotické mitogen-aktivované protein kinasy, často uváděné pod zkratkou MAPK, vytvářejí v eukaryotické buňce enzymatické dráhy, kterými přenášejí a zesilují extracelulární signály dovnitř buňky. MAPK signalizační dráhy se vyskytují u živočichů, rostlin a hub. Signály jsou přenášeny za pomoci tří typů reverzibilně fosforylovaných kinas: MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K, MAPKKK nebo také MEKK), MAP kinasy kinasy (MAP2K, MKK nebo MEK) a MAP kinasy (MAPK nebo MPK) (Nakagami *et al.*, 2005; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010). MAPK kaskády, pomocí fosforylace, přenáší signály přijaté na receptorech až na cílové substráty, kterými jsou například jiné druhy kinas, transkripční faktory nebo cytoskeletární proteiny (Ichimura *et al.*, 2002). MAPK signalizační dráhy jsou také známy pro své zapojení do regulace růstu rostlin, diferenciaci, buněčného cyklu, buněčné smrti a do odpovědi na stresové podmínky (Jonak *et al.*, 2002).

První zmínky o rostlinných MAPK jsou z roku 1993, kdy byla identifikována MsERK1 u vojtěšky (Duerr *et al.*, 1993) a D5 kinasa u hrášku (Stafstrom *et al.*, 1993). MAPK signalizační dráhy byly zaznamenány u různých druhů rostlin, nejlépe však byly prozkoumány u *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), kde bylo nalezeno 20 MAPK, 10 MAPKK a 80 MAPKKK (Colcombert a Hirt, 2008). *Arabidopsis thaliana* je řazena mezi dvouděložné rostliny. U jednoděložných rostlin jsou MAP kinasové dráhy nejlépe prostudovány u rýže (Agrawal *et al.*, 2003b, Hamel *et al.*, 2006) a méně u ječmene (Abass a Morris, 2013).

2.2.1.1 Aktivace MAPK kaskády

Aktivace MAPK souvisí se schopnostmi rostlin reagovat na vnější podněty. Jejich aktivace může být způsobena infekcí, patogenem, poraněním, nízkou a vysokou teplotou, suchem, hyper- a hypo – osmolaritou (Morris, 2001), sekundárními posly např. reaktivními formami kyslíku, oxidem dusnatým (NO), fosfolipidy nebo Ca²⁺ ionty (Xiong *et al.*, 2002). Aktivaci můžou způsobit také rostlinné hormony - auxiny, brassinosteroidy, kyselina abscisová i jasmínová a etylen (Devoto a Turner, 2003). Někdy bývá MAPK kaskáda rozvinuta o aktivátor MAPKKK zvaný jako MAPKKKK (MAP4K) (Keshet a Seger, 2010). MAPKK jsou aktivovány pomocí MAPKKK dvojitou fosforylací serinu nebo threoninu v S/T-X3-5-S/T motivu (S = serin, T = threonin, X = jakákoliv aminokyselina) (Nakagami *et al.*, 2005). Aktivace MAPK

pomocí MAPKK vyžaduje fosforylaci obou threoninových a tyrosinových reziduí T-X-Y (Y=tyrosin) v místě aktivační smyčky (T-smyčka) MAPK. Tato T-smyčka je lokalizována mezi VII. a VIII. kinasovou podjednotkou. Aktivované MAPK dále fosforylují jiné proteiny kinasy, složky cytoskeletu nebo mohou být přeměrovány do jádra, kde aktivují transkripční faktory, které indukují expresi určitých genů. Z tohoto důvodu je klíčovým regulačním mechanismem kontrolujícím aktivitu proteinů reverzibilní fosforylace jednotlivých kinas. Délka trvání a intenzita aktivace MAPK kaskády je určována rovnováhou mezi aktivním fosforylovaným stavem a neaktivním defosforylovaným stavem (Ichimura *et al.*, 2002). Jednotlivé interakce mezi komponentami MAPK kaskády jsou schématem znázorněny na obrázku 1.



Obr. 1 Schéma, zobrazuje MAPK kaskádu u *A. thaliana*, složenou z MAPKKK, MAPKK a MAPK. Popisuje šíření signálu přijatého na receptoru cytoplazmatické membrány směrem dovnitř buňky. Písmeno „P“ označuje anorganický fosfát a písmena „PP“ protein fosfatasu. Šipky na schématu naznačují směr dráhy.

2.2.1.2 Deaktivace MAPK kaskády

Inaktivace MAPK kaskády je řízena pomocí tyrosinových a serin-threoninových fosfatů (Luan, 2003). Byly identifikovány tři různé typy fosfatů: tyrosin fosfaty, serin – threonin fosfaty a dvojité specifické fosfaty. Za aktivitu jednotlivých MAPK fosfatů je zodpovědná zpětnovazební smyčka. K úplné deaktivaci MAPK je třeba defosforylace obou threoninových i tyrosinových reziduí. Jednotlivé fosfaty stejně jako MAPK mají různou subcelulární lokalizaci (Bartels *et al.*, 2010).

2.2.2 MAPK kinasy jednoděložných rostlin

2.2.2.1 MAPK kinasy rýže

Modelovou rostlinou jednoděložných rostlin je rýže (*Oryza sativa*) (Agrawal, 2003b). Jako model byla zvolena z důvodu malé velikosti genomu a značného významu v zemědělství (Huang *et al.*, 2002).

Rýžový genom obsahuje 74 MAPKKK, 8 MAPKK a 17 MAPK (Hamel *et al.* 2006; Reyna a Yang, 2006; Rao *et al.* 2010; Yang *et al.*, 2015). Různý počet těchto tří typů proteinů poukazuje na to, že MAPK kaskády mohou sdílet stejné MAPKK i MAPK nebo že se MAPKK a MAPK zapojují do vícerých biologických aktivit. Velké množství MAPKKK rovněž naznačuje, že MAPK dráhy mohou být důležité pro regulaci mnohých fyziologických procesů (Yang *et al.*, 2015).

První rýžová MAPK byla izolována z indické odrůdy IR36 a byla pojmenována BWMPK1(OsBWMK1). Prvotní studie prokázaly, že je vyvolaná infekcí patogenu *Magnaporthe grisea* a mechanickým poraněním. Molekulová hmotnost této MAPK je přibližně 60 kDa a již 4 hodiny po stimulu z vnějšího prostředí je aktivní. Jejím objevením bylo dokázáno zapojení MAPK do obranných mechanismů rýže (He *et al.*, 1999).

Dále byly úspěšně izolovány MAPK z indické a japonské rýže (Agrawal *et al.*, 2003; Lieberherr *et al.*, 2005; Liu a Xue, 2007). Z těchto studií o MAPK rýže vyplývalo, jakou významnou roli hrají při šíření signálu v buňce, od jeho příjmu a přenosu až po adaptaci na různé druhy biotického a abiotického stresu (Liu a Xue, 2007).

Velmi zajímavé jsou také studie s umlčenými nebo nad exprimovanými MAP kinasami u rýže. Transgenní linie rýže s nad exprimovanou OsMAPK5 (s 35S promotorem) vykazovala vyšší OsMAPK5 kinázovou aktivitu a zvýšenou toleranci vůči suchu, soli a chladu. Naopak transgenní linie s umlčenou OsMAPK5

vykazuje sníženou toleranci vůči výše uvedeným stresovým podmínkám, avšak zvýšenou odolnost proti bakteriálním a houbovým patogenům (Xiong a Yang, 2003).

2.2.2.2 MAPK kinasy ječmene

Rodina ječmenných MAPKs nebyla dosud systematicky popsána. Zapojení genové exprese, jako odpověď na stresovou situaci v rámci ječmenné MAPKs byla objevena po infekci *Blumeria graminis* (Eckey *et al.*, 2004). Zatím pouze u HvMPK4 byla prokázána významná funkce v závislosti na regulační odpovědi, jež souvisí se solným a biotickým stresem (Abass a Morris, 2013).

2.3 Vnímání stresových podmínek u rostlin

Současné rostlinstvo je výsledkem mnohaleté evoluce. Rostliny jsou neustále vystavovány nepříznivým podmínkám, na které se snaží adaptovat, což má zásadní význam na jejich růst a vývoj (Zhu, 2002).

Stres může být původu biotického či abiotického. Mezi abiotické faktory řadíme účinky vysokých i nízkých teplot, sucha, osmotického stresu či mechanického poranění. Naopak biotické faktory zahrnují působení patogenů, mikrobů či toxických látek, vznikajících jejich metabolismem. Mezi regulační mechanismy, kterými se rostliny snaží odolávat vnějším vlivům, řadíme různé syntézy hormonů (auxiny, gibereliny, kyselina abscisová aj.) a zahájení sekundární odpovědi a expresi různých genů (Devoto a Turner, 2003). Z mnoha signálních drah, které se zapojují se do obranných reakcí rostlin, patří MAPK k hlavním drahám zodpovědných za buněčnou odpověď (Tena *et al.*, 2001; Jonak *et al.*, 2002).

K ochraně proti patogenům (biotický stres) mají rostliny různé složky v buněčné stěně nebo mikrobiální elicitory, které rozpoznávají přítomnost patogenů. V místě průniku patogenů do buňky jsou produkovány charakteristické látky (signalizační molekuly) jako etylen, oxid dusnatý, kyselina jasmonová a jiné, které jsou součástí vzniku buněčné odpovědi (Cheong a Kim, 2010).

Dále se stresové podmínky projevují zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku v buňce – volných radikálů, jako například superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), peroxylový (ROO^{\cdot}), alkoxylový (RO^{\cdot}) a hydroperoxylový (HO_2^{\cdot}) radikál. Z těchto volných radikálů poté mohou vznikat toxické látky jako peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík (1O_2), kyselina chlorná ($HClO$) či ozón (O_3) (Quan *et al.*, 2008). Reaktivní formy kyslíku v buňce jsou nebezpečně toxické látky, které jsou příčinou

poškození proteinů, lipidů či genetické informace, co mívá za následek buněčnou smrt. Peroxid vodíku má však dvojí účinky v závislosti na jeho koncentraci. Vysoká koncentrace vede k buněčné smrti (Jabs *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996), naopak nízká koncentrace funguje jako signální molekula pro start různých obranných mechanismů při biotickém i abiotickém stresu (Quan *et al.*, 2008).

2.3.1 Solný stres (Osmotický stres)

Velké množství zemědělské půdy trpí vysokou koncentrací soli, zejména v oblastech, kde je nutnost zavlažování (Zhu, 2002; Tuteja, 2007). Velký význam pro rostlinu má voda, která hraje velkou roli při solném stresu a stresu vyvolaným suchem. Sůl při solném stresu vyvolává fyziologické sucho. Jelikož mají tyto dva typy stresu stejného jmenovatele, vodu, tak mají mnoho obranných mechanismů společných a také jejich signální dráhy se navzájem prolínají (Ingram a Bartels, 1996; Hasegawa *et al.*, 2000).

Osmotický stres je zahájen okamžitě po bezprostředním setkání buňky se zvýšenou koncentrací soli. Tento stres nemusí být striktně zahájen pouze solí, ale také hypertonickými roztoky s rozpuštěnými osmoticky aktivními látkami, jako jsou sacharosa, sorbitol a mnoho dalších (De Castro *et al.*, 2000; Lin a Kao, 2002; Bahaji *et al.*, 2003; Mazel *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Vollger *et al.*, 2011). Osmotický stres způsobuje změnu turgoru rostlinné buňky a jejího celkového objemu. Dále indukuje tvorbu a hromadění stabilizujících osmolytů a antioxidantů, kteří zvyšují toleranci vůči tomuto stresu (Hanson *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 2000).

Solný stres způsobuje několik typů poškození rostlin, velmi závažná je iontová toxicita (Munns a Tester, 2008), která způsobuje iontovou nerovnováhu a oxidační stres v buňkách (Zhu, 2003). Z tohoto důvodu je nutné pochopit mechanismus výměny Na^+ a K^+ iontů a jejich proteinů, které nám odhalí základní faktory tolerance rostlin při solném stresu (Munns, 2005; Munns a Tester, 2008). Mezi sofistikované mechanismy, které se vyrovnávají se solným stresem, řadíme kompartmentaci toxických iontů, selekci iontů, úpravy fotosyntetických a metabolických drah, akumulaci antioxidantních enzymů, regulaci hormonů či modifikaci buněčné stěny (Zhang *et al.*, 2012).

Rostlinná tolerance na sůl zahrnuje komplexní síť reakcí založených na genetickém podkladě (Munns, 2005; Munns a Tester, 2008). Identifikace a odhalení některých klíčových genů a příslušných proteinů by napomohla pochopení mechanismů odpovědi

roślin při solném stresu (Wu *et al.*, 2014). Z důvodu post-transkripčních a post-translačních změn proteinů jako glykosylace, fosforylace a protein-proteinová interakce je studium změn způsobených solným stresem na úrovni proteinů v buňce nejlépe vystihujícím přístupem (Zhang *et al.*, 2012). Obor zabývající se kvantitativní analýzou proteinů, nacházejících se v organismu za definovaných podmínek, se nazývá proteomika (Lottspeich, 1999).

Proteomika je často užívána pro studium abiotických stresových podmínek u rostlin (Urano *et al.*, 2010; Kosová *et al.*, 2011). Zhang *et al.* vytvořili databázi proteomických studií zabývajících se solným stresem u rostlin. Celkem identifikovali 561 unikátních proteinů u 34 rostlinných druhů ovlivněných solným stresem. Převážná většina analyzovaných proteomických studií pracovala s celkovými vyextrahovanými proteiny, méně časté byly práce, kde se pracovalo pouze s membránovými proteiny (Zhang *et al.*, 2012). Membránové proteiny jsou všechny proteiny vyskytující se v cytoplazmatické membráně a membráně organel. Rozdělujeme je do několika skupin: strukturní proteiny, kotvy, kinázy a transportéry zahrnující nosiče, enzymy a receptory (White a Wimley, 1999). Mnoho membránových proteinů se aktivně zapojuje do tolerančních mechanismů vůči solnému stresu např. H^+ a Ca^{2+} pumpy, Na^+ a K^+ transportní proteiny či různé symportéry a antiportéry (Yokoi *et al.*, 2002; Apse *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003).

U rýže bylo zaznamenáno 18 statisticky změněných membránových proteinů, produkovaných při podmínkách solného stresu v kořenovém systému, podílejících se na udržování stavu cytoplazmatické membrány, iontové homeostáze a šíření signálu v buňkách kořene (Cheng *et al.*, 2009). Je tedy zřejmé, že identifikace a charakterizace membránových proteinů přispěje k pochopení tolerančních mechanismů rostlin při solném stresu.

2.4 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který pomocí biochemických metod studuje strukturu, funkci a interakce proteinů. Zároveň hodnotí i translaci genetické informace, jež je v buňce vyjádřena jednotlivými peptidy a proteiny. Výraz proteom, od kterého je odvozen název tohoto vědního odvětví, byl poprvé použit v roce 1995 a byl definován jako proteinový ekvivalent genomu (Wasinger *et al.*, 1995). Po zveřejnění byl pojem postupem času formován a byly mu přesněji vytyčeny hranice (O'Farrell, 1975; Pandey a Mann, 2000; Thelen, 2007). Proteomiku řadíme mezi obory, které napomáhají odhalit biologické

procesy probíhající v buňce. Proteiny plní v buňce mnoho funkcí od stavební, zásobní, regulační přes signální, katalytické, transportní až po obranné.

2.4.1 Aplikace proteomiky v praxi

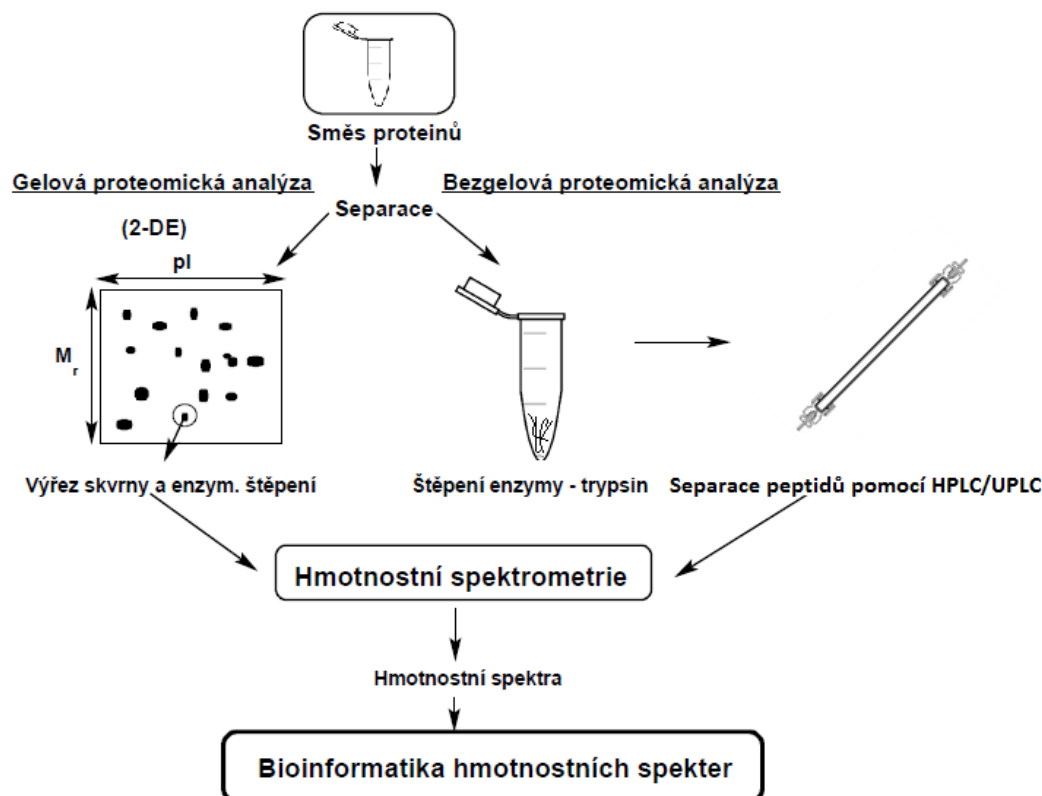
Proteomika má široké uplatnění v různých typech odvětví. V medicíně napomáhá odhalit příčiny a mechanismy chorob nebo se podílí na objevování nových markerů fyziologických stavů. Ve farmacii se podílí na hledání a vývoji nových léčiv (Pandey a Mann, 2000). Pro zavedení nových výrobních procesů a pro zjištění kvality i bezpečnosti potravin se využívá v potravinářském průmyslu. V dnešní době se zvyšujícím počtem lidí na Zemi a s tím spojenými zvýšenými poptávkami na kvalitní výchozí zemědělské plodiny, je proteomika často využívána jako nástroj pro zvýšení výnosů těchto plodin, pro šlechtění nových odrůd méně náchylných na stresové podmínky nebo plodin s nízkým obsahem škodlivých látek.

2.4.2 Proteomická analýza

Proteomická analýza je dlouhý a pracný proces zahrnující mnoho kroků. Na obrázku 2 je znázorněn základní proces analýzy proteinů. Existují dva přístupy proteomické analýzy: gelová a bezgelová proteomická analýza proteinů.

Gelový proteomický rozbor bude více rozveden níže, jedná se o standardní nástroj proteomiky. Tento rozbor má ovšem svá omezení, například: analýza omezené kapacity vzorku, problém identifikace proteinů o nízké koncentraci a částečně i reprodukovatelnost a kvantifikace proteinového vzorku. Tyto údaje jsou však nezbytné pro komplexní analýzu proteomu a popis fyziologických procesů v živém organismu (Gygi *et al.*, 1997). Proto byly vytvořeny různé zlepšení gelové analýzy (Görg *et al.*, 2004). I přes tato zlepšení, stále existují určitá omezení, což vedlo k vývoji jiných alternativních přístupů.

Bezgelová proteomická analýza se jeví jako nejlepší řešení. Bezgelový proteomický rozbor spočívá v naštěpení proteinového vzorku na peptidy, pomocí proteolytických enzymů, nejčastěji je užíván trypsin. Jednotlivé peptidy jsou následně rozděleny podle jejich povahy na chromatografické koloně. Separace může probíhat taky ve vícerozích krocích na více chromatografických kolonách seřazených za sebou. Nejčastěji separace probíhá na reverzních C18 kolonách a vymyté proteiny se dále identifikují pomocí hmotnostní spektrometrie (Roe a Griffin, 2006).



Obr. 2 – Schématické znázornění metod, nejčastěji aplikovaných při proteomické analýze. Šipky ukazují směr proteinového rozboru.

2.4.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)

Tuto metodu vyvinul a publikoval roku 1975 Patrick H. O'Farrell. Jedná se o spojení dvou elektroforetických metod: isoelektrické fokusace (IEF, 1.dimenze neboli 1.rozměr) a polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE, 2.dimenze či 2.rozměr) (O'Farrell, 1975). Cílem této metody bylo zajistit jednoduché a rychlé řešení pro získání informací o proteomu. Zajímavostí je, že nejdříve byla tato metoda označena jako spekulativní v časopise *Journal of Biological Chemistry*. I přes toto označení se tato metoda velmi rychle rozšířila (*JBC Centennial*, 2006). Počáteční nevýhodou byla nízká reprodukovatelnost metody z důvodu velkého počtu kroků při získání konečného výsledku ve formě dvourozměrné proteinové mapy. To se ovšem poměrně rychle vyřešilo jednoduchými technickými změnami (Bjellqvist *et al.*, 1982), komerčně prodávanými přístroji a pomůckami, kterými se metoda stala lehce reprodukovatelnou. V té době převzala 2-DE PAGE ústřední roli v řešení problémů v proteomice. V současné době se běžně po separaci proteinů pomocí 2-DE provádí identifikace proteinových skvrn za pomoci hmotnostní

spektrometrie (MS). Na jediném 2-DE gelu můžeme najít až 10 000 proteinových skvrn (Klose a Kobalz, 1995; Eisenberg *et al.*, 2000; Pandey a Mann, 2000; Jenkins a Pennington, 2001).

2.4.2.1.1 Příprava vzorku pro 2-DE

Dosažení co nejlepšího rozpuštění proteinového peletu je v proteomice velmi významný krok, který určuje kvalitu výsledku. Dobrá rozpustnost proteinů přispívá ke zvýšení počtu rozlišitelných spotů (Herbert, 1999). Rozpustnost proteinů navíc podmiňuje jejich separaci při isoelektrické fokusaci. Při úplném rozpuštění proteinů se zabrání ztrátám při isoelektrické fokusaci a zároveň je lepší přestup rozdělených proteinů na gel při polyakrylamidové gelové elektroforéze v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (Adessi *et al.*, 1997; Rabilloud *et al.*, 1997).

Hlavním cílem je tedy převedení proteinů do kapalného stavu, jejich denaturování, redukování a alkylace. Tyto kroky jsou nezbytné pro narušení vzájemného působení proteinů ve vzorku, což má za následek, že proteinová skvrna (spot) reprezentuje pouze jeden polypeptid (Rabilloud, 1996). Pro rozpouštění proteinového peletu se užívají pufrы, které obsahují chaotropní činidla, jako jsou močovina a thiomočovina, detergenty typu CHAPS, Triton X-100 nebo dodecylsírán sodný. Jako redukční činidlo je v pufru nejčastěji používán dithiothreitol (DTT). Kombinace močovina a thiomočovina je do pufru přidávána pro zrušení vodíkových můstků, ale také hydrofobních interakcí (Björhall *et al.*, 2005; Görg *et al.*, 2004). Pro zamezení interakcí jednotlivých hydrofobních domén proteinů se do pufru přidávají detergenty a redukční činidla, které mají obrannou funkci proti případné zpětné oxidaci disulfidických můstků (Bouchal a Kučera, 2003).

2.4.2.1.2 Isoelektrická fokusace (IEF)

Tato metoda pomocí vysokého napětí rozděluje solubilizované proteiny v elektrickém poli podle jejich isoelektrického bodu (pI), čímž vzniká první rozdělení proteinů při 2-DE.

Nejdříve se tato metoda prováděla v tenkých trubičkách (průměr: 1-2mm) naplněných gelem (CA-IEF), který obsahoval amfolyty zajišťující pH gradient (O'Farrell, 1975). Z důvodu nesnadné reprodukovatelnosti a složité manipulace se častěji používají komerčně vyráběné proužky gelu (stripy), které mají imobilizovaný pH gradient (IPG-IEF) (Bjellqvist *et al.*, 1982, Görg *et al.*, 2000). U trubičkové IEF je možné aplikovat pouze 100 µg vzorku, naproti tomu na IPG stripy až 5mg.

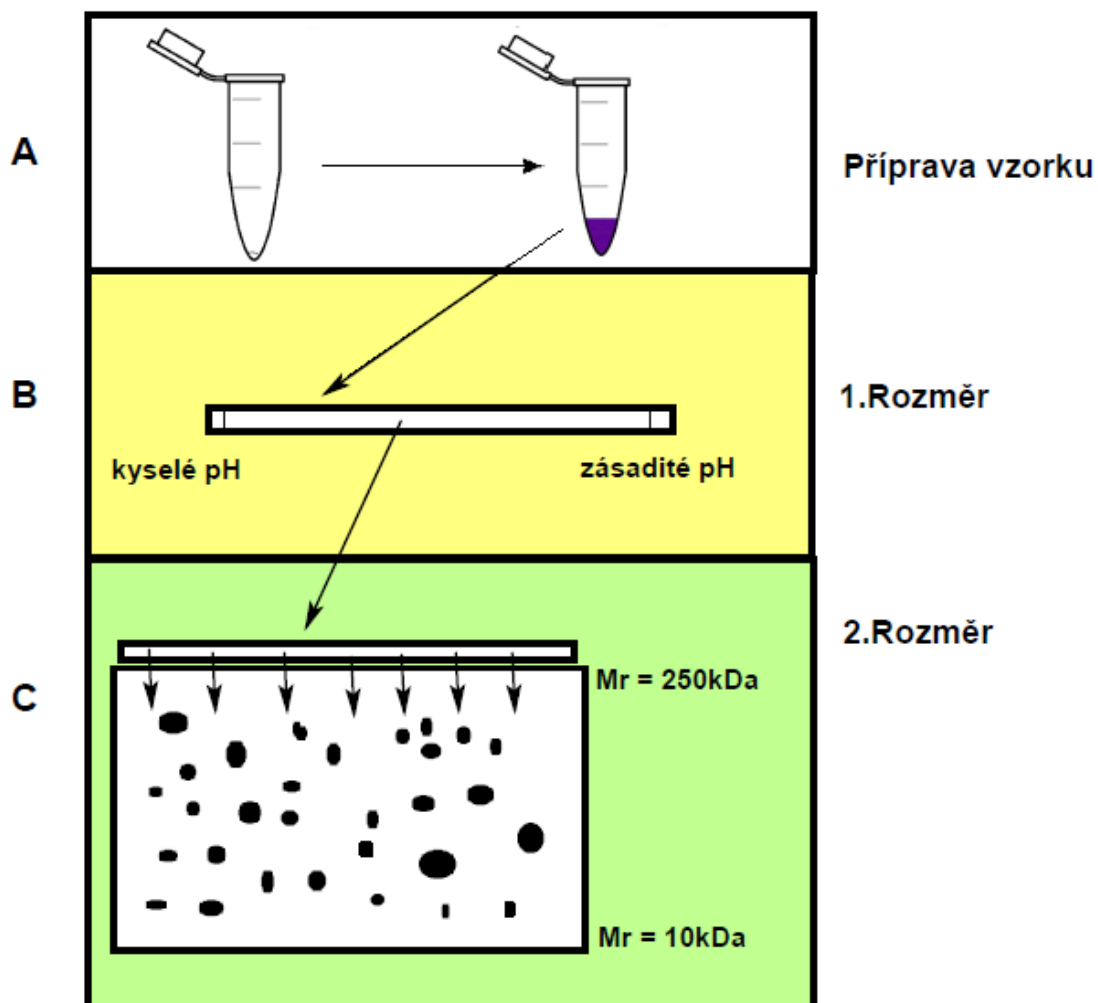
Větší množství naneseného vzorku umožňuje zachycení hydrofobních a slabě koncentrovaných proteinů, což má za výsledek větší počet identifikovaných proteinů ve vzorku (Bouchal a Kučera, 2003).

2.4.2.1.3 Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Před SDS-PAGE musí být proteiny, rozdělené za pomoci IEF, ekvilibrovány v ekvilibračním pufru. Nejdříve v ekvilibračním pufru s nějakým redukčním činidlem (například DTT) a poté v ekvilibračním pufru s alkylačním činidlem (amidem kyseliny jodoctové, IAA). Hlavním cílem těchto kroků je narušení proteinové struktury u vzorku pomocí redukce disulfidických vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami. Po této úpravě je trubičkový gel nebo IPG proužek položen na vrch polyakrylamidového gelu, který je mezi dvěma skly. Pro zlepšení přilnutí dvou přiložených gelů je IPG proužek/trubičkový gel zalit agarosou.

Polyakrylamidový gel obsahuje dodecyl-sulfát sodný (SDS), který uděluje proteinům uniformní náboj spojený s jednotkou relativní molekulové hmotnosti (Bouchal a Kučera, 2003). Po spuštění elektrického proudu do systému se proteiny předrozdělené isoelektrickou fokusací přenáší na polyakrylamidový gel, kde se dále rozdělují na základě molekulové hmotnosti a vzniká druhá dimenze 2-DE.

SDS-PAGE může probíhat horizontálně i vertikálně. Převážně se používá vertikální elektroforéza a to z důvodu většího využití, kdy se najednou může spustit více gelů (až 6). Polyakrylamidové gely se používají v různých koncentracích akrylamidu od 10 do 13%. V mnoha případech je užíváno spíše vyšší koncentrace, kdy gely bývají uniformnější (Görg *et al.*, 2000).



Obr. 3 – Schématické znázornění provedení 2-DE elektroforézy. Krok A popisuje přípravu vzorku. V levé mikrokumavce najdeme proteinový pelet, který se po dokonalém rozpuštění v pufru proměří na spektrofotometru pro zjištění koncentrace proteinů ve vzorku. Před aplikací na IPG strip se do proteinového vzorku připipetuje 1 μ l bromfenolové modři, který se přidává pro lepší orientaci při nanášení na IPG strip. Krok B popisuje isoelektrickou fokusaci, kdy se proteiny rozdělí podle svého isoelektrického bodu na IPG stripu. Krok C zachycuje přenos rozdělených proteinů na polyakrylamidový gel, kde se proteiny navíc rozdělí podle své molekulové hmotnosti a na obrázku je znázorněn výsledný 2-DE gel po barvení.

2.4.2.1.4 Vizualizace proteinových skvrn

Po provedení 2-DE je nutné rozdělené proteiny na gelu zakotvit a následně vizualizovat. Ukotvení proteinů může být zajištěno například několikahodinovým promýváním gelu v roztoku ethanol nebo kyselina octová a voda (Potáčová *et al.*, 2008). Více je však užíváno spojení těchto dvou kroků, kdy fixace probíhá zároveň při barvení (Bouchal a Kučera, 2003).

Vizualizace může být provedena několika způsoby, avšak každá metoda má své výhody a nevýhody. Nejčastěji se při vizualizaci proteinových SDS-PAGE gelů používá barvení pomocí barviva Coomasie brilliant blue nebo dusičnanu stříbrného. Barvení

gelů pomocí Coomasie brilliant blue je sice jednoduché, ale je zatíženo nízkým detekčním limitem (0,2μg/skvrna). Tímto barvením vizualizujeme pouze hlavní složky proteinového vzorku, tedy vysoko abundantní proteiny (Görg *et al.*, 2004). Naopak velkou výhodou tohoto kvantitativního barvení je, že gel se posléze může použít pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (Matsui *et al.*, 1999).

Další typ barvení je pomocí dusičnanu stříbrného, kdy detekujeme v proteinové směsi i proteiny o nízkých koncentracích. Stříbření je až 100x citlivější než barvení pomocí Coomasie brilliant blue. Problémem stříbření je však její reprodukovatelnost, díky subjektivnímu hodnocení intenzity barvení. V tomto naopak Coomasie brilliant blue nemá výrazné problémy. Další nevýhodou barvení pomocí dusičnanu stříbrného je, že se stříbrné ionty (Ag^+) váží pouze na některé aminokyselinové rezidua - Asp, Cys, Glu, His, Lys a Met. Proto se nepovažuje tato metoda za zcela kvantitativní (Rabilloud *et al.*, 1994).

V současné době se k barvení často užívá fluorescenčních barviv jako je Sypro Ruby, Sypro Orange, Sypro Red a jiných. Výhodou těchto barviv je, že detekují proteiny o nízké abundanci stejně jako stříbro a navíc takto barvené gely je možné použít na identifikaci rozdělených proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (Patton, 2000). Dalším kladem je také jejich širší dynamické rozmezí oproti výše uvedeným technikám barvení. Tato skutečnost značí vyšší efektivnost barvení (Herosimczyk *et al.*, 2006).

2.4.2.1.5 Vyhodnocení proteinových skvrn na gelu

Výsledkem 2-DE je gel, na kterém se po barvení objeví proteinové skvrny. 2-DE gely se následně skenují buď denzitometrickým dokumentačním skenerem, nebo v případě použití fluorescenčních barviv fluorescenčními skenery. Proteinové mapy vzniklé na 2-DE gelu je třeba kvantitativně i kvalitativně vyhodnotit (Potáčová *et al.*, 2008). Vyhodnocení se dělá za pomoci softwaru, který zahrnuje nejméně tyto 3 kroky: detekce proteinových skvrn, kvantifikace skvrn a zaměření skvrn odpovídající jednomu proteinu na více vložených gelech (Rosengren *et al.*, 2003). Na trhu je k dispozici mnoho softwarových programů provádějících tuto analýzu - například program PDQuest (Bio-Rad, USA) nebo program ImageMaster. (Amersham Biosciences, USA).

2.4.2.1.5.1 PDQuest

Mezi základní funkce softwaru PDQuest patří: automatická detekce a zaměření skvrn na gelu, propracovaná kvantifikace, funkce pro statistickou analýzu, flexibilní funkce vizualizace a zařazovací funkce pro porovnávací analýzu. Vyhodnocení probíhá v 2-D

projekci Gaussova obrazu, který má za úkol minimalizovat ruční úpravy tím, že odděluje sloučené a překrývající se místa. Navíc program využívá funkce, kterými rozpozná a odstraní nespecifické tečky, jako jsou nečistoty a jiné artefakty na gelu. Propracované odstranění pozadí zajistí poměrně přesnou kvantifikaci proteinů o nízké abundanci. PDQuest pracuje s různými normalizačními metodami, které minimalizují chyby při detekci proteinových skvrn. Co se týče statistického výstupu výsledků, mohou si uživatelé nastavit statistické hladiny významnosti, s kterými chtějí pracovat, a aplikovat na detekované proteinové skvrny různé statistické analýzy. Tento software zároveň umožňuje porovnání více experimentů mezi sebou (Bio-Rad, 27.3.2015).

2.4.2.1.6 Nevýhody 2-DE

Ačkoliv je 2-DE vhodná metoda pro rozdělení komplexních směsí proteinů, má také jisté nevýhody. Mezi hlavní nevýhody této metody řadíme nízkou hladinu detekce a následné identifikace proteinů s nízkým výskytem ve vzorcích. Barvením a vizualizací pomocí Coomassie Brilliant Blue se zobrazí pouze ty proteiny, které se nacházejí ve vzorku ve středních nebo vyšších koncentracích (Corthals *et al.*, 2000; Anderson a Anderson, 1998). Pro částečné odstranění této nevýhody se využívá afinitních technik, kdy jsou ze vzorku odstraněny proteiny s vysokým zastoupením. Například při extrakci proteinů z listů rostlin se enzym RUBISCO (ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa) nachází v 30% - 50% zastoupení. Přesný výskyt tohoto enzymu závisí na typu rostliny (Feller *et al.*, 2008). Pomocí afinitní chromatografie jsme schopni ze vzorku vychytat enzym RUBISCO, a proto tímto způsobem můžeme obohatit vzorek o proteiny, které jsou žádané (Lopez, 2000a). Při použití afinitního nosiče s navázaným konkavalinem A obohacujeme vzorek o glykosylované proteiny (Lopez, 2000a; Lopez *et al.*, 2000). Mimo afinitní chromatografii je vhodná taky prefrakcionace vzorků. Nejjednodušší je frakcionace na samotné organely. Frakcionace podle náboje může být provedena během samotné isoelektrické fokusace, pokud je použit pH gradient o malém rozpětí (Collinsová a Jiráček, 2004). Jiné možnosti prefrakcionace můžeme nalézt v publikaci Righetti *et al.*, 2003. Nevýhodou je však pracnost a časová náročnost na provedení, do jisté míry i zručnost pro tvorbu reprodukovatelných gelů (Quadroni a James, 1999). Některé nevýhody 2-DE se obejít nedají, zručnost se zlepšuje praxí a časová náročnost se postupnými optimalizacemi a novými technikami pomalu snižují.

2.4.2.2 Identifikace proteinů

Za pomoci kalibrace získáváme z 2-DE gelů informace o jednotlivých proteinech, jejich isoelektrickém bodě a molekulové hmotnosti. Nicméně tyto hodnoty nejsou jednoznačné, spíše přibližné. Z tohoto důvodu je nutné určit primární strukturu proteinů, která zaručí jednoznačnou identifikaci proteinů (Bouchal a Kučera, 2003).

K identifikaci slouží různé typy metod jako například: Edmanovo odbourávání, hmotnostní spektrometrie, metoda specifické detekce požadovaného proteinu pomocí protilátky (Western blotting) a jiné. Za pomoci zjištěných údajů o primární struktuře můžeme jednotlivé proteiny identifikovat v různých proteinových databázích (Swiss-Prot, TrEMBL, PIR, OWL).

2.4.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Tato metoda je v současné době nejvíce využívaná v rámci identifikace proteinů. Funguje na principu měření poměru hmotnosti a náboje (m/z) iontů pocházející ze vzorků.

Mezi nejčastěji využívané metody hmotnostní spektrometrie používané při identifikaci a kvantifikaci proteinů jsou měkké ionizační techniky, jako bývá laserem zprostředkovaná desorpce vzorku v přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) MALDI-TOF MS (Karas a Hillenkamp, 1988) a ionizace vzorku pomocí elektrospreje (Electrospray Ionization, ESI-MS) (Whitehouse *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1988; Fenn *et al.*, 1989). Tyto dva typy se od sebe liší způsobem ionizace. Roku 2002 byla za objevení měkké ionizace a její využití při strukturální analýze biomakromolekul udělena Nobelova cena, a tu získali John B. Fenn a Koichi Tanaka.

Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze zdroje ionizace, analyzátoru a detektoru. Zdroj ionizace má za úkol vytvořit ionty, analyzátor má funkci rozdělit jednotlivé ionty podle jejich poměru hmotnosti a náboje. Detektor detekuje nabitě částice tím, že zesiluje jejich odezvu, aby se z ní stal měřitelný signál (Parker *et al.*, 2010).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Bio-Rad: akrylamid, Precision Plus Protein standards

Duchefa Biochemie: pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Penta: ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

Sigma-Aldrich: 2-merkptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$), 2-propanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), amfolyty, amid kyseliny jodoctové (IAA), bromfenolová modř, činidlo Bradfordové, dihydrát molybdenanu disodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), dithiotreitol (DTT), dodecylsulfát sodný (SDS), dusičnan amonný (NH_4NO_3), dusičnan draselný (KNO_3), glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), heptahydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), hovězí sérový albumin (BSA), hydroxid draselný (KOH), hypochlorid sodný (NaClO), CHAPS detergent, chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina etylendiamintetraoctová EDTA ($[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$), kyselina octová (CH_3COOH), kyselina trihydrogenboritá (H_3BO_3), methanol (CH_3OH), močovina ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), peroxodisíran amonný (APS), sacharosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), tetrahydrát chloridu manganatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), thiomočovina ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$), Tris-base, Tris-pufrovaný fenol (pH 8,8), Triton X-100, Tween 20, železná sůl EDTA (Fe-EDTA).

3.1.2 Přístroje

Analytické váhy XA110/2X - Radwag (Polsko), centrifuga Scan Speed 1730 MR - Scala Scientific (Nizozemsko), digestoř – Merci (ČR), elektromagnetická míchačka MSH-420 - Boeco (Německo), fokusátor Ettan IPGphor 3 - GE Healthcare (USA), hlubokomrazicí box (-80°C) MDF-U500VX-PE – Panasonic (Japonsko), kultivační komora - Weiss Gallenkamp (Velká Británie), Image Scanner III - Epson (Japonsko), laboratorní předvážky S1502 - BEL (Itálie), laminární box Faster – Schoeller instruments (ČR), lednice (4°C) Space plus – Electrolux (Švédsko), lyofilizátor SednVac – Labogene (Dánsko), mražák (-20°C) Liebherr – Scholler instruments (ČR), pH metr PC 2700 - Eutech Instruments (Singapur), pipety Eppendorf Research plus – Eppendorf (Německo), sonifikátor Elmasonic P – Elma (Německo), spektrofotometr -

Backman Coulter (USA), termoblok – Bioer (Čína), vortex Genie – Scientific Industries (USA), výkyvná třepačka MR-12 - Biosan (Lotyšsko), zdroj pro elektroforézu Electrophoresis Power Supply EPS 601- GE Healthcare (UK).

3.1.3 Rostlinný materiál

Zrna divokého typu ječmene setého - *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace a příprava rostlinného materiálu pro pěstování

Zrna divokého typu ječmene setého (cv. *Golden Promise*) byla povrchově sterilizována. Sterilizace semen probíhala v laminárním boxu, kdy zrna byla umístěna v 50 ml tubách. Zrna byla po dobu 30 sekund promývána 70% etanolem (7,29 ml 96% ethanolu; 2,71 ml destilované vody), a pak byla 3 krát promyta destilovanou vodou. Následovala aplikace 5% hypochloridu sodného (5 ml - destilované vody; 5 ml - 10% hypochloridu sodného) po dobu 4 minut. Zrna se opět promyla 4 krát destilovanou vodou a nechala se stát ve vodě 1 hodinu. Na navlhčený filtrační papír byla zrna vyskládána vedle sebe a filtrační papír byl stočen. Následně byl takto stočený filtrační papír přenesen do 1 l kádiny, kde bylo přilito asi 200 ml destilované vody. Takto zpracovaný materiál byl ponechán 3 dny v lednici při 4 °C. Tento krok je nutný pro další stupeň pěstování, klíčení ječmene.

3.2.2 Pěstování ječmene

Po třech dnech byla zrna vytažena z ledničky a ponechána v kultivační místnosti s konstantní teplotou 22 °C, relativní vlhkostí 70 % a fotoperiodou 16/8 hod. Po vyklíčení zrn byly rostliny přesazeny do truhlíku s Hoaglandovým roztokem, který byl čerán provzdušňovačem. Po nárůstu prvních dvou lístku nadzemní části byly rostliny rozděleny na kontrolní a stresované. Solný stres byl nasazen 10. den od vytažení zrn ječmene z ledničky. Stresovaným rostlinám byl přidáván do roztoku chlorid sodný o výsledné koncentraci 150 mmol·l⁻¹. Jak stresované, tak kontrolní rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti za výše uvedených podmínek. Hoaglandův roztok byl měněn 2 krát týdně. Solný stres pro rostliny trval 22 dnů. Celkové stáří rostliny při sklizení ječmene bylo 32 dnů. Celkově byly vypěstovány dvě biologické opakování za stejných podmínek ve stejné kultivační místnosti.

Zásobní roztoky na Hoaglandovo médium

A) 1 mol·l⁻¹ dusičnanů

101,1g – KNO₃; 236,1g – Ca(NO₃)₂ · 4H₂O; 80g – NH₄NO₃

- destilovaná voda doplněna na objem 1 litr

B) 1 mol·l⁻¹ MgSO₄

246,5g – MgSO₄ · 7H₂O

- destilovaná voda doplněna na objem 1 litr

C) 1 mol·l⁻¹ Fe – EDTA

7,5g – Fe – EDTA

- destilovaná voda doplněna na 0,5 litru

D) Mikronutrienty

2,86g – H₃BO₃; 1,8g – MnCl₂ · 4 H₂O; 0,2g – ZnSO₄ · 7 H₂O; 0,08g – CuSO₄ · 5 H₂O;

0,025g – Na₂MoO₄ · 2H₂O

- destilovaná voda doplněna na 1 litr

E) 1 mol·l⁻¹ KH₂PO₄ (pH = 6)

136g – KH₂PO₄

- pH bylo upravováno 10 mol·l⁻¹ KOH
- destilovanou voda byla doplněna na 1 litr

Tab. 1 Příprava 1 litru Hoaglandova média

Složka	Objem (ml)
Destilovaná voda	989,5
1 mol·l ⁻¹ dusičnanů	5
1 mol·l ⁻¹ MgSO ₄	2
1 mol·l ⁻¹ Fe – EDTA	1,5
Mikronutrienty	1
1 mol·l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ (pH = 6)	1

Složky byly přidávány do roztoku chronologicky v pořadí jako v tabulce 1.

Pokud byl připravován roztok pro vyvolání stresových podmínek, bylo vždy přidáváno do roztoku 8,77 g NaCl na 1 litr Hoaglandova roztoku. Výsledná koncentrace chloridu sodného v roztoku byla 150 mmol·l⁻¹.

3.2.3 Sklizení ječmene a fenotypizace kořenového systému

Oddělení listů od kořenů předcházelo vážení celé rostliny na digitálních váhách a focení jednotlivých rostlin. Listy a kořeny byly zvlášť vloženy do jednotlivých 15ml tub a zmrazeny tekutým dusíkem. Takto zpracovaný materiál byl uchován v mrazicím boxu na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího zpracování. Za pomoci programu ImageJ byly měřeny všechny kořenové systémy jednotlivých rostlin. Fenotypové změny délek kořenů byly vyhodnocovány za pomoci tabulkové aplikace Microsoft Excel.

3.2.4 Příprava rostlinného homogenátu

Zmražené listy a kořeny byly postupně homogenizovány v třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rostlinný homogenát byl následně uskladněn v mrazicím boxu na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a byl použit pro proteomickou analýzu.

3.2.5 Lyofilizace listového homogenátu

Listový homogenát byl lyofilizován za pomoci vakuového vymrazování v lyofilizátoru při $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 0,4 mBar.

3.2.6 Měření koncentrace listových barviv

Koncentrace listových barviv byla provedena podle článku Lichtenthaler (1987). Na analytických váhách bylo do 15ml tuby odváženo přibližně 5 mg lyofilizovaného homogenátu listu, bylo přidáno 100 μl destilované vody a směs byla ponechána 10 min. inkubaci. Poté bylo přidáno 8 ml 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, směs byla zvortexována, takto připravený materiál byl zabalen do alobalu a inkubován přes noc v digestoři. Následující den byla směs zvortexována a proměřena na spektrofotometru (470,0 nm, 648,6 nm a 664,2 nm). Koncentrace jednotlivých barviv byly vypočteny podle níže uvedených vzorců.

$$\text{Chlorofyl a: } C_A = \frac{(13,36 \cdot A_{664,2} - 5,19 \cdot A_{648,2}) \cdot 8,1}{m_{\text{sušina}}} \quad (\text{mg/g sušiny})$$

$$\text{Chlorofyl b: } C_B = \frac{(27,43 \cdot A_{648,6} - 8,12 \cdot A_{664,2}) \cdot 8,1}{m_{\text{sušina}}} \quad (\text{mg/g sušiny})$$

$$\text{Chlorofyl a+b: } C_{A+B} = \frac{(5,24 \cdot A_{664,2} + 22,24 \cdot A_{648,6}) \cdot 8,1}{m_{\text{sušina}}} \quad (\text{mg/g sušiny})$$

$$\text{Celkové karotenoidy: } C_{\text{karotenoidy}} = \frac{(4,785 \cdot A_{470} + 3,657 \cdot A_{664,2} - 12,76 \cdot A_{648,6}) \cdot 8,1}{m_{\text{sušina}}} \quad (\text{mg/g sušiny})$$

3.2.7 Extrakce proteinů z kořenového systému

Z kořenových homogenátů ječmene byly extrahovány a precipitovány celkové proteiny podle publikace Hurkman a Tanaka, (1986) a Takáč *et al.*, (2011). Ke kořenovému homogenátu (přibližně 0,3 g) bylo přidáno 0,7 ml extrakčního pufru (6,156 g sacharózy; 2 ml $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,8; 0,058 g EDTA; 0,149 g KCl; 2 μl 2-merkptoethanolu; rozpuštěno v destilované vodě na objem 20 ml), vychlazeného v lednici na 4 °C. Po aplikaci byla suspenze ponechána 5 minut při laboratorní teplotě a následně 10 minut na ledě. Všechny další kroky byly prováděny na ledě. Dále bylo ke směsi připipetováno 0,7ml Tris-pufrovaného fenolu o pH 8,8. Suspenze byla promíchána na vortexu a inkubována 30 minut za občasného promíchání. Následovala centrifugace ve vychlazené centrifuze při těchto podmínkách: 4 °C, při 8000 g, po dobu 5 minut. Vytvořená fenolová fáze byla odebrána do zkumavky a k zbylé vodné fázi bylo přidáno 0,5 ml extrakčního pufru a 0,5 ml Tris-pufrovaného fenolu o pH 8,8, aby proběhlo reextrahování menšího množství proteinů obsažených ve vodné fázi. Suspenze byla centrifugována podle stejných parametrů jako první centrifugace. Druhá získaná fenolová fáze byla přidána k první fenolové fázi.

3.2.8 Precipitace a čištění vyextrahovaných proteinů

Fenolová fáze byla rozpipetována po 300 μl do zkumavek s objemem 2 ml a bylo k ní přidáno pětinasobné množství (1500 μl) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu amonného ve 100% metanolu (3,85 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ bylo rozpuštěno v 500 ml 100% metanolu) vychlazeného na -20 °C. Směs byla promíchána a uložena do mrazničky při teplotě -20 °C přes noc. Již po hodině se daly sledovat obláčky vysrážených proteinů. Další den byla suspenze centrifugována ve vychlazené centrifuze na 4 °C, při 13000 g, po dobu 30 minut. Supernatant nad peletem proteinů byl opatrně odpipetován a k peletu bylo opět přidáno $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu amonného ve 100% metanolu. Proteinový pelet byl rozsuspendován za pomoci vortexu a suspenze se ponechala 15 minut v mrazničce při -20 °C. Po inkubaci byla suspenze stočena na centrifuze při 13000 g, teplotě 4 °C, po dobu 10 minut. Tímto způsobem byl proteinový pelet pročištěn 2x 80% acetonem, 2x 70% etanolem a naposledy 80% acetonem, jelikož 70% etanol, nepříznivě ovlivňuje rozpustnost proteinového peletu do konečného roztoku.

3.2.9 Rozpouštění proteinového peletu a měření koncentrace vzorků

Po posledním zcentrifugování směsi, ve vychlazené centrifuze při 13000 g, 4 °C, po dobu 10 minut, byl 80% aceton odpipetován. Zkumavka byla ponechána 25 minut otevřena, aby se pelet prosušil. Posléze bylo připipetováno 100 µl rehydratačního pufru - RP (9,609 g močoviny; 3,044 g thiomčoviny; 0,4 g CHAPS; 0,4 ml Triton X-100; vše bylo rozpuštěno postupně v destilované vodě na objem 20 ml; z tohoto zásobního roztoku se vždy odebíral potřebný objem, do kterého se ještě na 1 ml roztoku přidávalo 0,0077 g DTT a 0,005 ml amfolytů) a suspenze byla propipetována, aby se pelet lépe rozbil a rozptýlil v rehydratačním pufru. Dále byla suspenze inkubována 1 hod. při laboratorní teplotě a následně ponechána v lednici při 4 °C do dalšího dne, kdy se koncentrace proteinů, proměřila na spektrofotometru, dle metody Bradfordové (1976).

3.2.10 Dvourozměrná elektroforéza (2-DE)

Tato separační, proteomická metoda pracuje na principu rozdělení proteinů, nejdříve podle jejich rozdílného isoelektrického bodu, za pomoci isoelektrické fokusace a poté podle jejich molekulové hmotnosti, za pomoci polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE).

3.2.10.1 Isoelektrická fokusace proteinů

Po naměření koncentrace proteinů, byly připraveny vzorky s objemem 125 µl, které obsahovaly 80 µg proteinů a 2 µl bromfenolové modři. Tyto vzorky byly napipetovány do jamek a gelovou stranou na vzorky byly přidány 7cm IPG stripy o rozsahu pH 5-8. Vzorky byly ponechány, aby se přes noc nasály do gelových proužků. Vzorky s IPG stripy byly vloženy do plastového kufříku, který zajistil ochranu před nečistotami a zároveň vytvořil inkubaci ve tmě. Další den byla připravena přístrojová technika pro isoelektrickou fokusaci a do jamek porcelánové destičky, která byla vložena v isoelektrickém fokusátoru, byl připipetován minerální olej. Do jednotlivých jamek s olejem byly vloženy 7 cm IPG stripy se vzorky a pomocí elektrod byly propojeny s fokusátorem. Na počítači, který byl spojen s fokusátorem, byly v programu EttanIPGphor3 nastaveny parametry fokusace: 1. konstantní napětí 300 V po dobu 40 min., 2. gradientové zvýšení na 1000 V za 27 min., 3. gradientové zvýšení na 5000 V za 1 hod. 30 min. a 4. konstantní napětí 5000 V po dobu 1 hod. 24 min. Celkové napětí bylo 12 000 V a čas fokusace přibližně 4 hod. 30 minut.

3.2.10.2 Úprava proteinů rozdělených na 7 cm IPG stripech

Po fokusaci byly proteiny ekvilibrovány v ekvilibrační roztoku (36,035 g; 3,33 ml 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl o pH 8,8; 2 g SDS; 30 ml glycerolu, 0,2 ml bromphenolblue, směs byla rozpuštěna v destilované vodě a výsledný objem byl upraven na 100 ml – zásobní roztok). Úprava probíhala ve 2 fázích: redukce disulfidových vazeb přidáním dithiothreitolu (DTT – 0,01 g na 1ml ekvilibračního roztoku) a alkylace pomocí amidu kyseliny jodoctové (IAA – 0,025 g na 1 ml ekvilibračního roztoku). Obě fáze probíhaly po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

3.2.10.3 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS–PAGE)

Stripy byly aplikovány na 12% (w/v) rozlišovací polyakrylamidový gel (na přípravu 1 gelu: 217 µl destilované vody; 125 µl 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,8; 150 µl 40% akrylamidu; 5 µl 10% SDS; 0,25 µl TEMED; 2,5 µl 10% APS). Stripy byly zaktoveny 0,5% roztokem agarosy, obarvené bromfenolovou modří. SDS-PAGE probíhala v Tris-glycin-SDS pufru (3,035 g Tris; 14,413 g glycin; 1 g SDS) nejdříve při 60 V (přibližně 30 min.), v tomto kroku byly přenášeny separované proteiny z IPG stripu na polyakrylamidový gel. Přenos proteinů byl detekován posunem bromfenolové modří z 0,5% (w/v) agarosy do gelu. Poté bylo zvýšeno napětí na 100 V. SDS-PAGE byla ukončena v čase, kdy modrý pás bromfenolové modří, byl na spodním konci gelu (přibližně 2-3 hod.).

3.2.10.4 Barvení gelů a kvantifikace denzity skvrn

Gely byly barveny po dobu 2 hodin komerčním barvivem Bio - Safe Coomassie G-250 Stain. Poté byly promývány destilovanou vodou a to do doby, než se odbarvilo pozadí. Barvení a následné promývání bylo prováděno na třepačce při laboratorní teplotě. Takto připravené gely byly oskenovány na denzitometrickém dokumentačním skeneru a vloženy do programu PDQuest 8.0. Proteinové skvrny byly detekovány automaticky programem PDQuest 8.0 v rámci jednotlivých biologických opakováních, kdy nesprávně přiřazené skvrny byly manuálně přiřazeny ke správné skvrně. Software PDQuest 8.0 provedl statistickou analýzu na hladině významnosti 90% a 95%, za pomoci t-testu. Do úvahy byly přijaty proteinové skvrny lišící se abundancí s hodnotou pravděpodobnosti $p \leq 0,1$.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Fenotypizace

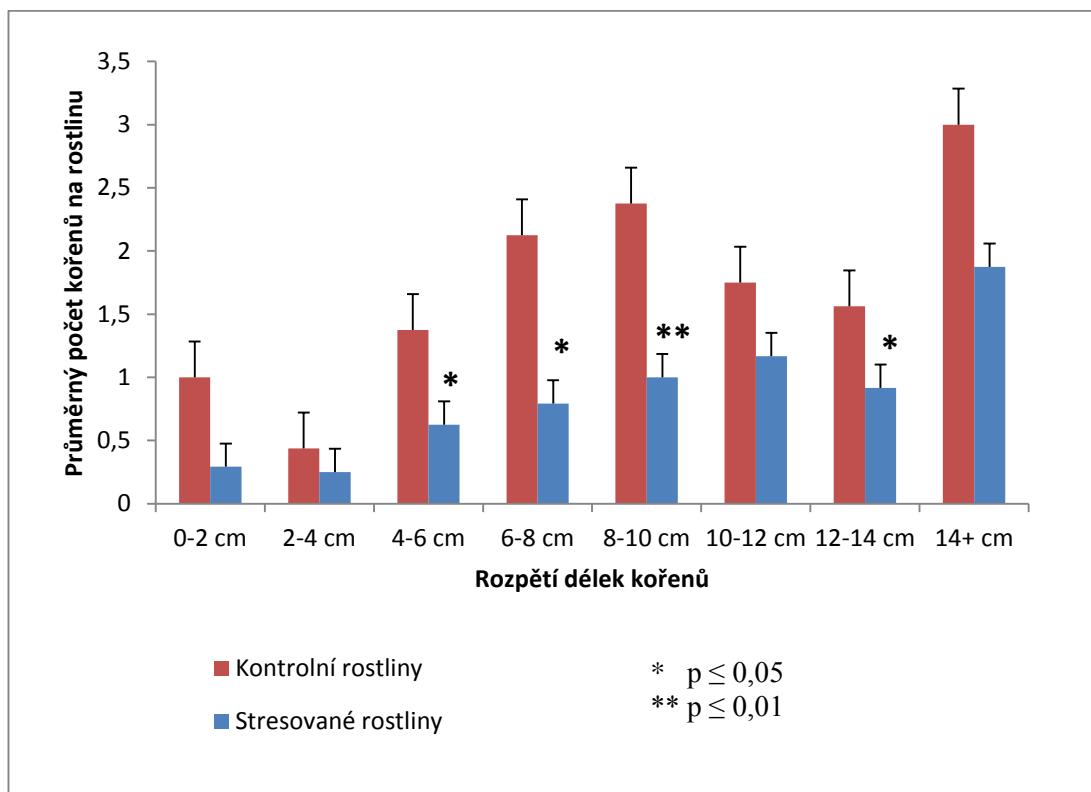
V této části jsou prezentovány výsledky pozorování změn kořenových délek, změny v koncentracích listových barviv obsažených v listech testovaných rostlin a rozdíly v čerstvé hmotnosti u kontrolních a stresovaných rostlin.

4.1.1 Kořenové fenotypové změny u ječmene setého po aplikaci soli

Vliv solných podmínek (koncentrace NaCl 150 mmol·l⁻¹) na fenotyp plodiny byl testován na ječmeni setém (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise. Celkově byly vypěstovány dvě biologické opakování. Za pomoci softwaru ImageJ byly naměřeny jednotlivé délky kořenů.

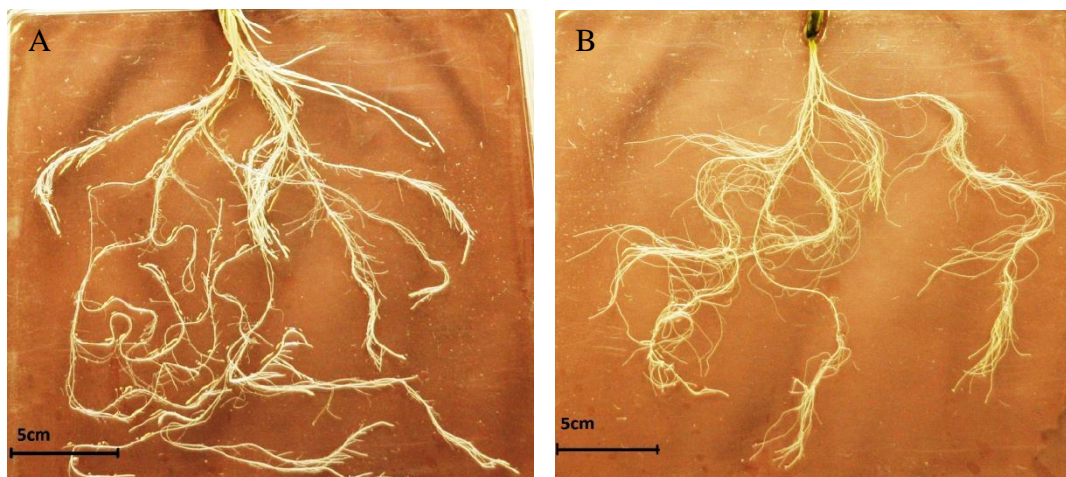
Solný stres je reprezentativní abiotický stres, který snižuje růst rostlin (Munns a Tester, 2008). Podle předpokladů, u kontrolních rostlin byly naměřeny nejdelší délky kořenů. Již po pár dnech byly zaznamenány signifikantní rozdíly v inhibici růstu kořenu stresovaných rostlin. Solný stres vyvolává významné snížení kořenové propustnosti pro vodu, čímž vyvolává tzv. fyziologické sucho. Tento jev byl zaznamenán u mnoha plodin jako je kukuřice, rajče nebo paprika (Azaizeh H. a Steudle E., 1991; Peyrano *et al.*, 1997; Carvajal *et al.*, 1999; Martinez-Ballesta *et al.*, 2000; Martinez-Ballesta *et al.*, 2003).

Z naměřených hodnot byly vytvořeny tabulky a grafy závislosti průměrného počtu kořenů na rostlinu ve vybraných délkových úsecích kořenů u kontrolních a stresovaných rostlin. Z těchto údajů vyplynulo, že dvě biologické opakování vykazují obdobné výsledky. Pro prezentaci výsledků byly dvě biologické opakování zkompletovány a byl vytvořen jeden graf zachycující výsledky kořenového fenotypu (Obr. 4). Nejdelší naměřené kořeny patřily kontrolním rostlinám a měřily přes 14 cm, proto je konečným délkovým úsekem kořenů rozsah 14 a více cm (14+ cm). Předcházející rozsahy délek kořenů jsou voleny od 0cm po 2cm dále. Průměrný počet kořenů u kontrolních rostlin převyšoval průměrný počet kořenů u stresovaných rostlin ve všech měřených délkových úsecích kořene. Při úsecích 4-6 cm, 6-8 cm a 12-14 cm byla za pomoci t-testu určena statistická hladina významnosti 95% ($p \leq 0,05$) a při délkovém úseku 8-10cm byla prokázána hladina významnosti 99% ($p \leq 0,01$). Při délkovém úseku kořenů 0–2 cm, byl u kontrolních rostlin zaznamenán rozdíl více než dvojnásobný oproti stresovaným rostlinám, avšak t-testem nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Malé rozdíly v délkových úsecích kořenů byly vyhodnoceny u rozsahů 2-4cm a 10-12cm.



Obr.4 - Grafický záznam vlivu soli na průměrný počet kořenů v různých délkových úsecích kořenů u stresovaných a kontrolních rostlin. Červená barva sloupce značí kontrolní rostliny a modrá rostliny stresované solí. Nad jednotlivými sloupci jsou vyznačeny směrodatné odchylky a hvězda je symbolem statistické hladiny významnosti.

Dalším fenotypovým parametrem, ve kterém se kontrolní a stresované rostliny lišily, byla mohutnost kořenového systému u těchto jednoděložných rostlin. Typ kořenové soustavy jednoděložných rostlin je homorizický, což znamená, že hlavní kořen v raném vývoji zastavuje růst a jeho funkce přebírají náhradní nebo-li adventivní kořeny (Kalina a Slavíková, 2003). Z adventivních kořenů vyrůstají bočné kořeny, které zvyšují efektivnost zisku vody a minerálních živin. U kořenového systému kontrolních rostlin byly pozorovány mohutnější adventivní kořeny s nižším počtem bočných kořenů oproti stresovaným rostlinám. Rozdíly u bočných kořenů nebyly pouze v jejich počtu, ale také v jejich délce. Stresované rostliny měly viditelně delší bočné kořeny (Obr. 5). Tento fenotypový rozdíl nám podává informaci o jednom z mechanismů obrany této plodiny vůči solným podmínkám. Rostlina pravděpodobně vydává energii na tvorbu bočných kořenů, čím se adventivní kořeny méně vyvíjejí než je tomu u kontrolních rostlin. Vyšším počtem bočných kořenů, chce rostlina pravděpodobně zvýšit příjem vody a minerálních živin.



Obr. 5 – Kvalitativní porovnání kořenového systému kontrolní rostliny (A) a stresované rostliny (B), 22 dnů pěstované v solných stresových podmínkách. Celkové stáří rostlin 32 dnů.

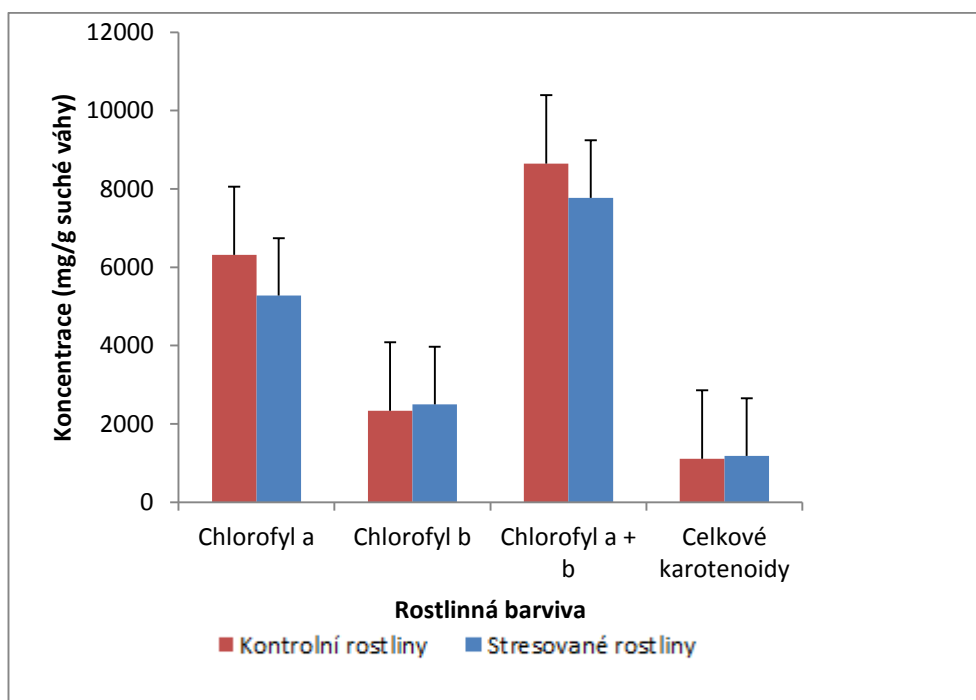
4.1.2 Fenotypová změna u listů ječmene setého po solném stresu

Faktory ovlivňující obsah rostlinných pigmentů a barviv byly zkoumány již od dob uvedení Mendelovy dědičnosti (Nybom, 1955). Rostlinná barviva obsažená v listech, pohlcují a regulují světelnou energii přijatou pro fotosyntézu. Listová barviva plní funkci fotosynteticky aktivních pigmentů. Patří zde chlorofyly (a + b) a karotenoidy (β -karoten, lykopen, violaxantin, lutein). Chlorofyly fungují jako přijmače světelné energie a karotenoidy zajišťují ochranu fotosyntetického aparátu před případnou nevratnou fotooxidací (Armstrong a Hearst, 1996; Meskauskiene *et al.*, 2001).

Koncentrace fotosynteticky aktivních pigmentů jsou významné pro určení stavu fotosyntetického aparátu v rostlině. Tento ukazatel závisí na mnoha faktorech, jako je například druh rostliny, stáří listů, podmínky růstu nebo výživa.

Nejjednodušší stanovení koncentrace chlorofylů a celkových karotenoidů je pomocí spektrofotometrie. Tato metoda byla použita i v tomto případě (Lichtenthaler, 1987). Na obr. 6 jsou znázorněny změny koncentrace listových barviv u ječmene setého při solném stresu a při kontrolních podmínkách. Koncentrace chlorofylu „a“ v kontrolních rostlinách je vyšší než u stresovaných rostlin, ale hodnota koncentrace chlorofylu „b“ je naopak nižší. Chlorofyly „a“ a „b“ přijímají světelnou energii v různých vlnových délkách. Chlorofyl „a“ přijímá světlo ve vlnové oblasti 430nm a jeho zastoupení je nejvyšší ze všech listových barviv (pokrývá $\frac{3}{4}$ obsahu všech listových barviv). Chlorofyl „b“ přijímá světlo o vlnové délce 480nm, ale jeho obsah není tak vysoký. Z důvodu sníženého množství chlorofylu „a“ ve stresovaných rostlinách můžeme předpokládat, že fotosyntéza byla v mírném útlumu oproti

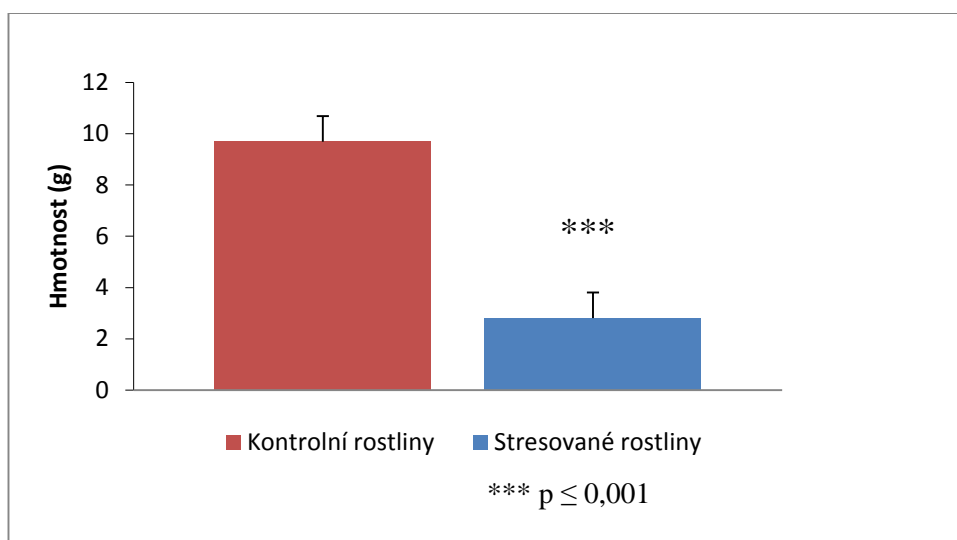
kontrolním rostlinám. Obsah celkových karotenoidů ve stresovaných rostlinách je o málo vyšší než u kontrolních rostlin. Naměřené hodnoty rostlinných barviv byly podrobeny t-testu, který ukázal, že mezi kontrolním a stresovanými rostlinami není statisticky významný rozdíl. Koncentrace chlorofylů „a“ a „b“ podává informaci o světelné fázi fotosyntézy, kdy chlorofyl „a“ se více uplatňuje ve fotosystému I a chlorofyl „b“ ve fotosystému II. Málo zvýšená koncentrace chlorofylu „b“, ve stresované rostlině, může být další obrannou reakcí rostliny na solný stres, reagující na více sníženou hladinu chlorofylu „a“ u stresované rostliny. Minimálně byla zvýšena i hladina celkových karotenoidů u stresovaných rostlin, což mohlo být důsledkem zvýšené hladiny chlorofylu „b“, přijímající světlo i vyšší vlnové délce než chlorofyl „a“.



Obr.6 - Koncentrace rostlinných barviv (mg/g suché váhy) v mladých listech ječmene setého u kontrolních a stresovaných rostlin. Červená barva sloupce značí kontrolní rostliny a modrá rostliny stresované solí. Nad jednotlivými sloupci jsou vyznačeny směrodatné odchylky.

4.1.3 Rozdíl v čerstvé hmotnosti u ječmene setého po aplikaci solného stresu

Když byl biologický experiment u konce, byly jednotlivé rostliny váženy (čerstvá hmotnost rostlin). Na obr. 7 jsou uvedeny rozdíly v čerstvé hmotnosti kontrolních a stresovaných rostlin. Pomocí t-testu byl prokázán statisticky významný rozdíl na hladině 99,9 % ($p \leq 0,001$). Vzniklý rozdíl může být vysvětlen nižším obsahem vody ve stresovaných rostlinách a zároveň menším vývinem orgánů oproti kontrolním rostlinám. Jev je nejspíše zapříčiněn solí vyvolaným fyziologickým suchem, popsáným výše.



Obr. 7 – Grafické porovnání průměrné čerstvé hmotnosti kontrolních a stresovaných rostlin. Červeně je zaznačena průměrná čerstvá hmotnost kontrolních rostlin a modře stresovaných rostlin. Nad jednotlivými sloupci jsou vyznačeny směrodatné odchylky a hvězdy jsou symbolem statisticky významné hodnoty.

4.2 Dvourozměrná elektroforetická analýza proteinů z kořenů ječmene setého po solném stresu

4.2.1 Optimalizace rozpouštění proteinového peletu

Z důvodu malé efektivity rozpouštění proteinového peletu po fenolové extrakci a následné precipitaci, bylo přistoupeno k optimalizaci podmínek rozpouštění a složení RP (složení je uvedeno v kapitole metody). Jednotlivé optimalizační testy byly hodnoceny vizuálně. Tyto testy byly prováděny pouze pro naši orientaci, pro kvantifikaci by musela být měřena absorbance na spektrometru, aby byly viditelné přesné rozdíly.

Proteinové pelety byly připraveny ve stejných alikvotách, aby byla zajištěna stejnorodost proteinového materiálu. Nejdříve byly prováděny zkoušky týkající se podmínek rozpouštění a poté zkoušky se změnami koncentrací některých složek RP.

Podmínky pro rozpouštění proteinového peletu byly čerpány z publikací Hurkman a Tanaka (1986) a Takáč *et al.*, (2011). Krokem předcházejícím rozpouštění peletu je pročištění precipitovaných proteinů. V posledním kroku pročištění je proteinový pelet rozsuspendován v 80% acetonu, který je po stočení na centrifuze odpipetován. Otevřená zkumavka s proteinovým peletem je položena na čistý filtrační papír, aby se pelet prosušil a odpařil se veškerý aceton. V tomto kroku byl proveden optimalizační test, který určil dobu prosušení peletu. Proteinový pelet se nechal prosušit 5, 10, 15, 20, 25, 30 a 60 minut. Po přidání RP se proteinový pelet nejlépe rozpouštěl po 25 minutách prosušení. Dalším krokem je inkubace rozpouštějícího se vzorku, při laboratorní teplotě. Rozpouštějící vzorek byl po 30, 45, 60, 75, 90 a 120 minutách promíchán pipetováním. Výsledkem této zkoušky bylo zjištění, že po 60 minutách nenastává žádná razantní změna, týkájí se rozpouštění peletu. V tomto kroku byla vyzkoušena i sonifikace v ultrazvukové lázni, kdy vzorky byly 3 krát po 10 minutách a 3 krát po 20 minutách sonifikovány. Ani jedna z variant, však ve velké míře nepřispívala k rozpouštění našeho rostlinného materiálu. Pro lepší rozpouštění proteinů, byly vzorky ponechávány přes noc v lednici při 4°C.

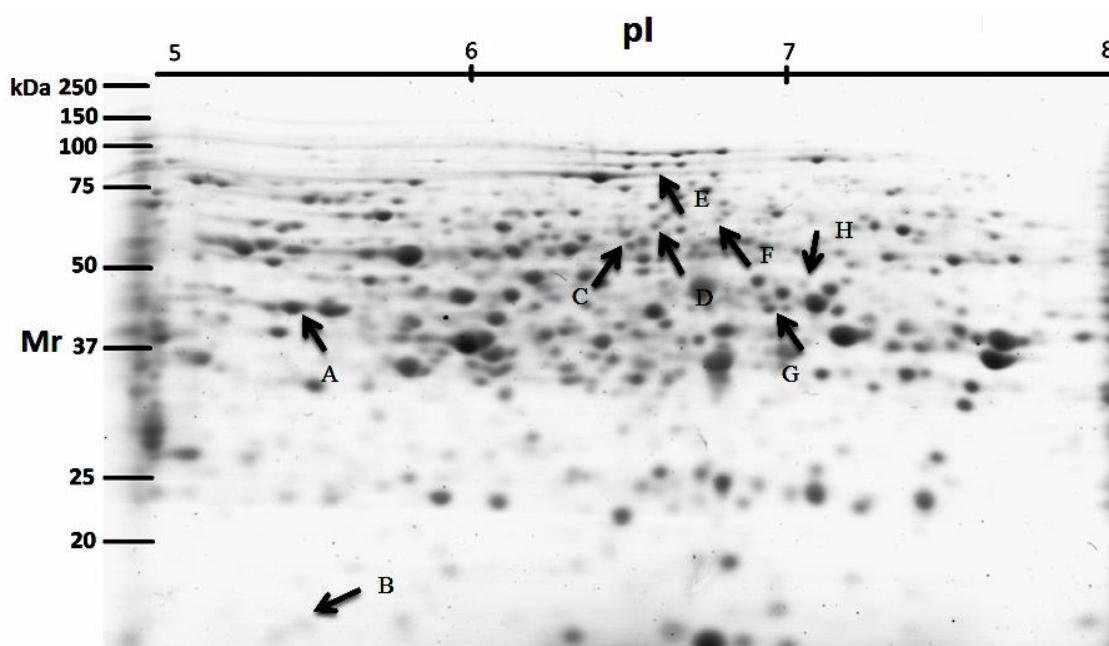
Optimalizační testy se změnami koncentrací vybraných složek RP (močovina, thiomčovina) nepřinesli žádnou změnu v původním složení, pouze bylo ověřeno, že původní koncentrace jsou v optimálním poměru.

Tyto dva optimalizační testy byly prováděny za podmínek, které byly podle výše uvedených testů nejlepší.

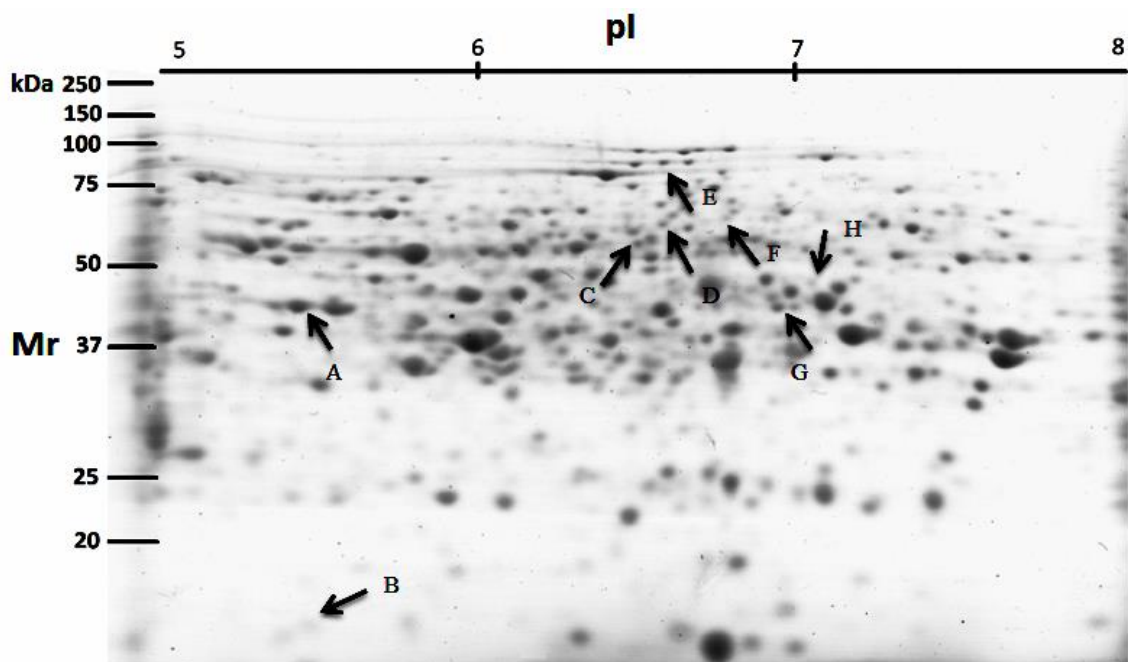
4.2.2 Proteomická analýza

Změny v kořenovém proteomu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise po solném stresu byly detekovány za pomoci dvourozměrné elektroforézy. Z 300 mg kořenového homogenátu se po extrakci, precipitaci a přečištění získalo více než 80 μg proteinů. Jednotlivé dvourozměrné proteinové gely byly dokumentovány denzitometrickým dokumentačním skenerem. Naskenované 2-D gely byly vloženy do vyhodnocovacího softwaru PDQuest 8.0 (Bio-Rad). Za pomoci tohoto softwaru byly vyhodnoceny změny optické denzity detekovaných proteinových skvrn v kořenovém systému kontrolních a stresovaných rostlin.

Na dvourozměrných gelech z kontrolních rostlin bylo detekováno průměrně 220 (± 1) skvrn (obr. 8) a na dvourozměrných gelech ze stresovaných rostlin 204 ($\pm 0,5$) skvrn (obr. 9). Přesný počet detekovaných skvrn na 2-D gelu, počty spárovaných proteinových skvrn a míra shody jsou znázorněny a uvedeny v tab. 2.



Obr. 8 – Reprezentativní dvourozměrný gel kořenového proteomu kontrolní rostliny ječmene setého (7 cm IPG strips (pH 5 – 8), 12% SDS-PAGE gel). Vodorovné měřítko o rozsahu 5 – 8 značí rozdělení proteinů podle isoelektrického bodu (pI) a vertikální měřítko značí hodnotu molekulové hmotnosti (Mr) v kDa.



Obr. 9 – Reprezentativní dvourozměrný gel kořenového proteomu stresované rostliny ječmene setého (solný stres, $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$), (7 cm IPG strips (pH 5 – 8), 12% SDS-PAGE gel). Vodorovné měřítko o rozsahu 5 – 8 značí rozdělení, podle isoelektrického bodu (pI), vertikální měřítko hodnotu molekulové hmotnosti v kDa.

Tab. 2 – Přehled počtů detekovaných proteinových skvrn na dvourozměrných gelech kořenového systému kontrolních a stresovaných rostlin, jejich spárování (proteinová skvrna z kontrolních rostlin s proteinovou skvrnou ze stresovaných rostlin) a míra shody. Označení kontrola a stres značí, z jakého kořenového systému proteiny pocházejí.

Biologické opakování	2D-gel	Počet skvrn	Spárovaných skvrn	Míra shody
1	Kontrola	221	213	96,4%
	Stres	203	198	97,5%
2	Kontrola	219	213	97,3%
	Stres	204	194	95,1%

Optická denzita proteinových skvrn vyhotovených z kořenového systému kontrolních rostlin sloužila jako kontrola pro určení změn v optické denzitě proteinových skvrn u stresovaných rostlin. Podle zvýšeného nebo sníženého trendu v optické denzitě jednotlivých proteinů, byly všechny identifikované proteiny rozděleny do několika skupin. Celkové změny v optické denzitě detekovaných skvrn zachycuje tab. 3. Počet detekovaných proteinových skvrn se sníženou optickou denzitou, po 22 denním solném stresu, byl vyšší než počet proteinových skvrn se zvýšenou optickou denzitou. Z toho se dá předpokládat, že v kořenových buňkách stresovaných rostlin docházelo převážně ke katabolickým reakcím (Uváčková *et al.*, 2012).

Katabolismus je soubor buněčných rozkladných procesů a anabolismus je souhrn všech syntetických reakcí probíhajících v buňce. Pokud je katabolismus a anabolismus

v rovnováze, buňka neroste (Chalupová-Karlovarská, 2010). Předpokládáný vyšší počet katabolických reakcí v stresovaných buňkách oproti kontrolním má za následek inhibovaný růst celého organismu, což je v souladu s pozorovaným fenotypem kořenového systému ječmene setého.

Z celkového počtu detekovaných skvrn v 2-D gelech bylo za pomoci softwarového t-testu nalezeno 21 statisticky významných skvrn na hladině významnosti 90 % ($p \leq 0,1$) a 8 statisticky významných skvrn na hladině významnosti 95 % ($p \leq 0,05$). Na obr. 8 a 9 jsou vyznačené statisticky významné proteinové skvrny, vyhodnocené softwarem na hladině významnosti 95 %.

Studie autorů Wu *et al.*, 2014 je nejaktuálnější prací týkající se účinků soli na ječmen setý. Publikace ovšem pracuje s jinými odrůdami ječmene – tibetským ječmenem XZ16 a s odrůdou CM72, která je známá pro svou vysokou odolnost vůči soli. Autoři této publikace vytvořili dvourozměrné gely z proteinů kořenového systému i dvourozměrné gely z proteinů obsažených v listech, čímž pokryli celkové změny v metabolismu ječmene. U obou testovaných odrůd bylo zaznamenáno šest statisticky významných proteinových skvrn ($p \leq 0,05$) se sníženou denzitou. Tento výsledek je obdobný s výše uvedeným.

Tab. 3 – Souhrn softwarově vyhodnocených změn v optické denzitě proteinových skvrn kořenového systému ječmene setého ovlivněného solným stresem. Optická denzita proteinových skvrn z kořenového systému stresovaných rostlin byla porovnávána s optickou denzitou proteinových skvrn kořenového systémem kontrolních rostlin.

Trend	Změna abundance	Počet detekovaných proteinů
Snížený	≥ 3 krát	5
	1,5 – 3 krát	55
	1 - 1,5 krát	70
Zvýšený	1 – 1,5 krát	29
	1,5 – 3 krát	26
	≥ 3 krát	7

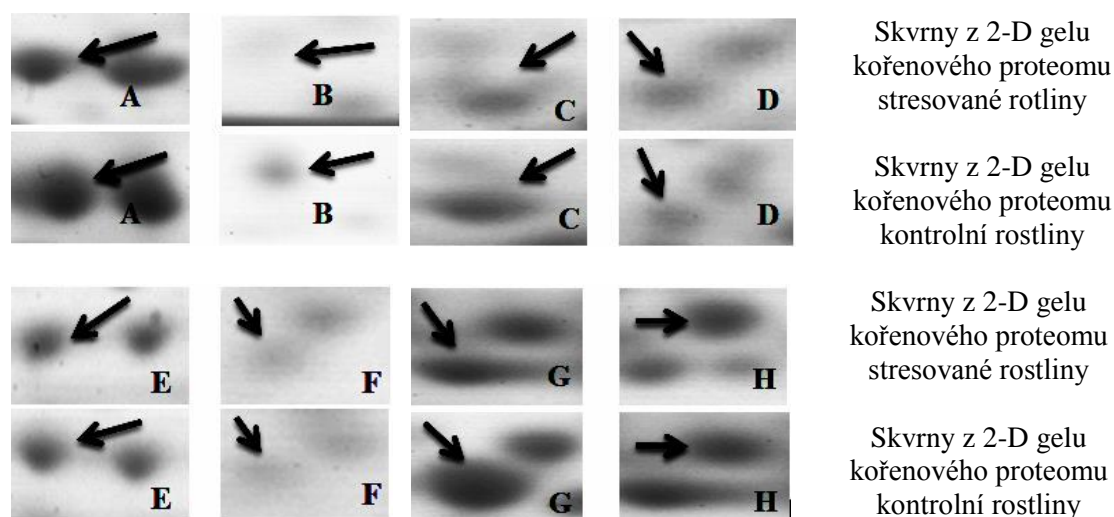
V dalších krocích byly určovány parametry osmi proteinových skvrn, které byly vyhodnoceny t-testem na statistické hladině významnosti 95%. Za pomoci markeru molekulové hmotnosti byla odečtena orientační molekulová hmotnost uvedených proteinových skvrn a podle pevného imobilizovaného pH gradientu na IPG stripu byla určena orientační hodnota isoelektrického bodu daného proteinu. Parametry jednotlivých osmi proteinů se změnou abundancí na statistické hladině významnosti 95% jsou uvedeny v tab.4.

Jelikož nebyla dosud sestavena 2-D proteinová mapa identifikovaných proteinů ječmene setého, jako je tomu například u *Arabidopsis sativa* nebo *Escherichia coli*, nebylo možné porovnat námi orientačně určené parametry proteinů s identifikovanými proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie. Porovnávání proběhlo i v rámci publikace Wu *et al.* 2014, která řeší stejnou problematiku. Ovšem ani zde nebyla nalezena shoda, což je možné vysvětlit tím, že jednak autoři této práce pracovali s jinou odrůdou ječmene setého, ale také použili odlišnou metodu extrakce proteinů, barvení gelů nebo rozsah pI.

Tab. 4 – Přibližné parametry jednotlivých proteinů, které byly softwarovým t-testem vyhodnoceny jako statisticky významné, na hladině významnosti 95% ($p \leq 0,05$).

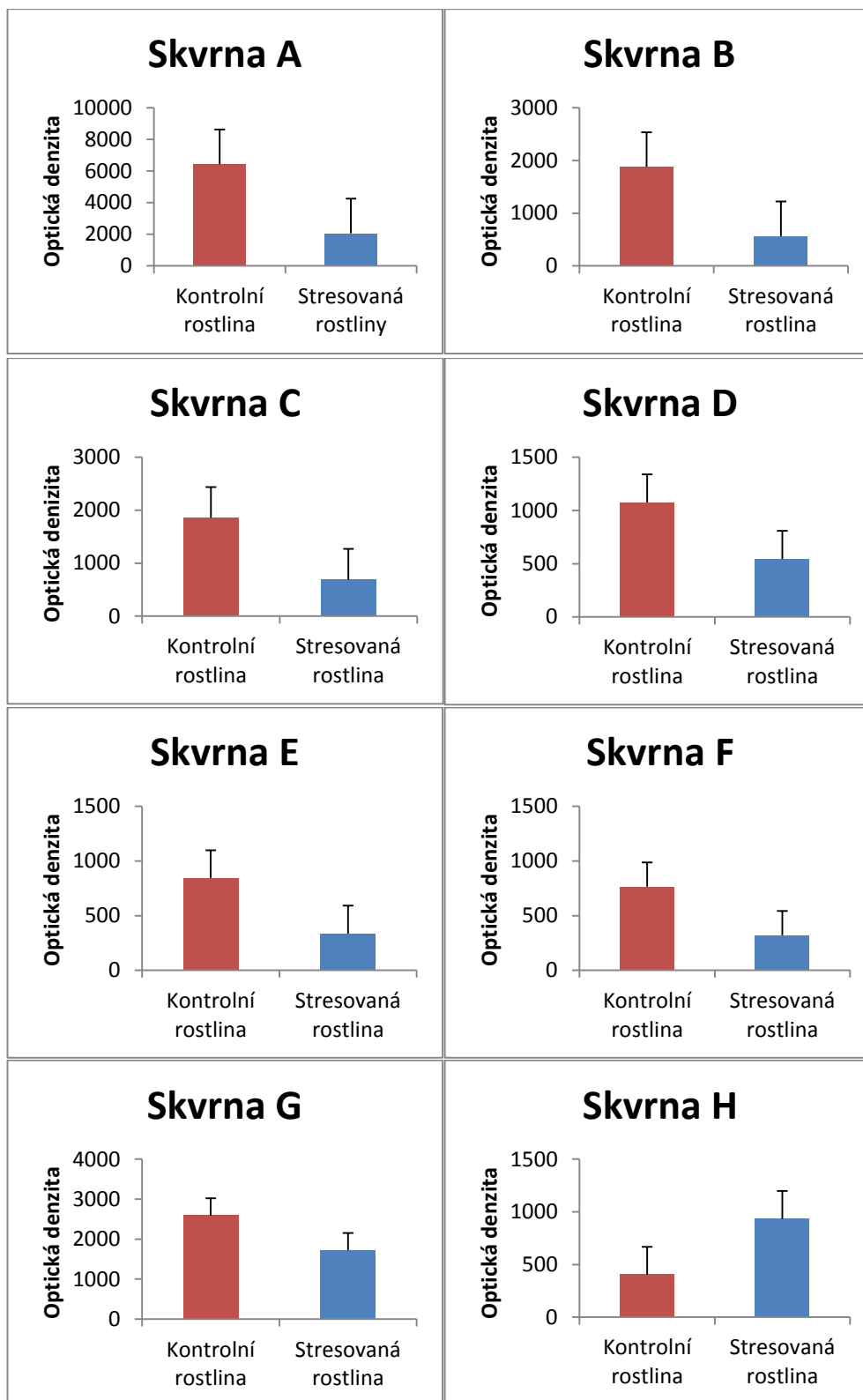
Skvrna	Isoelektrický bod (pI)	Mol. Hmotnost (kDa)	Trend, změna abundance
A	5,47	50	Snížení; 3,14 krát
B	5,42	16	Snížení; 3,32krát
C	6,65	69	Snížení; 2,69 krát
D	6,76	70	Snížení; 1,97 krát
E	6,83	98	Snížení; 2,51 krát
F	7,04	73	Snížení; 2,39 krát
G	7,21	44	Snížení; 1,50 krát
H	7,31	49	Zvýšení; 2,31 krát

Pro lepší přehled změn optické denzity, byly zhotoveny detailní výřezy osmi proteinových skvrn se statistickou hladinou významnosti 95% (Obr.10).



Obr. 10 – Detailní pohled na jednotlivé proteinové skvrny označené na dvourozměrném gelu z obr. 8 a 9 písmeny A-H. Tyto proteinové skvrny byly softwarově označeny jako statisticky významné ($p \leq 0,05$).

Optická denzita těchto osmi proteinových skvrn se pohybovala v různých rozsazích. Hodnoty optických denzit jednotlivých proteinových skvrn, vyhotovených z dvou biologických opakování, byly zprůměrovány a z těchto hodnot byly vypočítány změny optické denzity. Graficky jsou tyto změny znázorněny na obr.11. Tyto proteinové skvrny budou později identifikovány za pomoci hmotnostní spektrometrie.



Obr. 11 – Grafické porovnání průměrné optické denzity proteinových skvrn detekovaných na dvourozměrných gelech kořenového systému kontrolních a stresovaných rostlin. Červená barva označuje skvrny detekované na dvourozměrných gelech kontrolních rostlin a modrá barva odpovídá skvrnám detekovaným na dvourozměrných gelech stresovaných rostlin.

5 Závěr

Teoretická část této bakalářské práce pojednává o MAPK signálních drahách, zaměřujících se na MAPK kaskády jednoděložných rostlin. Shrnuje všeobecné poznatky vlivu stresových podmínek na rostliny. V souvislosti s navazující praktickou částí se v teoretické části uvádí sumarizace vlivu solného stresu na rostliny a metody proteomické analýzy.

Praktická část se zabývá sledováním fenotypových změn u ječmene setého po aplikaci solného stresu po dobu 22 dní ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) a porovnání těchto změn s fenotypem kontrolních rostlin. Dále tato část pojednává o proteomické analýze kořenového systému ječmene setého po ovlivnění solným stresem. Byly porovnávány detekované proteiny z kořenového systému kontrolních rostlin vůči stresovaným.

Na základě vyhodnocených výsledků bylo zjištěno, že kořenový systém ječmene po solném stresu dorůstá do kratších délek s vyšším počtem bočných kořenů než u kontrolních rostlin a zároveň jsou tyto bočné kořeny mnohem delší, což souvisí pravděpodobně se snahou plodiny získat více vody a živin.

Ze stanovení koncentrace listových barviv můžeme předpokládat mírnou inhibici fotosyntézy, právě díky nižší koncentraci chlorofylu „a“ u stresovaných rostlin a následně předpokládaného sníženého příjmu světelného záření o vlnové délce 430nm.

Celková inhibice růstu a omezený příjem vody vyvolaný zvýšenou koncentrací soli v živném médiu byl potvrzen rozdílem v čerstvé hmotnosti kontrolních a stresovaných rostlin na konci experimentu.

Metodou dvourozměrné elektroforézy byla separována komplexní směs extrahovaných kořenových proteinů z ječmene setého. Z důvodu špatného rozpouštění proteinového peletu, byly provedeny optimalizační testy definující ideální podmínky pro rozpouštění uvedeného proteinového peletu. Softwarem PDQuest 8.0 bylo na dvourozměrných gelech určeno osm statisticky významných skvrn ($p \leq 0,05$). Z vyššího počtu detekovaných proteinových skvrn se sníženou denzitou se dá předpokládat, že v buňkách probíhali převážně katabolické reakce (Uvačková *et al.*, 2012).

Hypotéza s vyšším počtem katabolických reakcí u stresovaných rostlin v porovnání s kontrolními rostlinami byla v souladu se sledovanou inhibicí růstu kořenů u stresovaných rostlin. Definitivní potvrzení předpokladu zvýšeného množství katabolických reakcí u stresovaných rostlin oproti kontrolním rostlinám, je možné

identifikací jednotlivých statisticky významných proteinových skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie.

6 Literatura

- Abass M., Morris P.C. (2013): The *Hordeum vulgare* signalling protein MAP kinase 4 is a regulator of biotic and abiotic stress responses. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1353-1359.
- Adessi C., Miege C., Albrieux C., Rabilloud T. (1997): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 127-135.
- Agrawal A.A. (2001): Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* **294**, 321-326.
- Agrawal G.K., Agrawal S.K., Shibato J., Iwahashi H., Rakwal R. (2003a): Novel rice MAP kinases OsMSRMK3 and OsWJUMK1 involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**, 775-783.
- Agrawal G.K., Iwahashi H., Rakwal R. (2003b): Rice MAPKs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 171-180.
- Anderson N.L., Anderson N.G. (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-61.
- Apse M.P., Sottosanto J.B., Blumwald E. (2003): Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal* **36**, 229-239.
- Armstrong G.A., Hearst J.E. (1996): Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB Journal* **10**, 228-237.
- Azaizeh H., Steudle E. (1991): Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology* **97**, 1136-1145.
- Bahaji A., Aniento F., Cornejo M.J. (2003): Uptake of an endocytic marker by rice cells: variations related to osmotic and saline stress. *Plant and Cell Physiology* **44**, 1100-1111.
- Baker N.R. (2008): Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annuals Review of Plant Biology* **59**, 89-113.
- Bargmann B.O., Munnik T. (2006): The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 515-522.
- Bartels S., Besteiro M.A.G., Lang D., Ulm R. (2010): Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant in Science* **15**, 322-329.
- BioRad home page: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_3121C.pdf (27.3.2015)
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. (1982): Isoelectric-focusing in immobilized pH gradients - principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **6**, 317-339.
- Björhall K., Miliotis T., Davidsson P. (2005): Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **5**, 307-317.
- Bouchal P., Kučera I. (2003): Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: Principy a aplikace. *Chemické Listy* **97**, 29-36.
- Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Carvajal M., Martinez V., Alcaraz C.F. (1999): Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum* **105**, 95-101.
- Colcombert J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Collinsová M., Jiráček J. (2004): Současný vývoj v proteomice. *Chemické Listy* **98**, 1112 - 1118.
- Corthals G.L., Wasinger V.C., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C. (2000): The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-1115.
- De Castro R.D., van Lammeren A.A.M., Groot S.P.C., Bino R.J., Hilhorst H.W.M. (2000): Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but

- DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology* **122**, 327-335.
- Devoto A., Turner J. G. (2003): Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Annals of Botany* **92**, 329-337.
- Dreiseitl A. (2003): Adaptation of Blumeria graminis f. sp. hordei to barley resistance genes in the Czech Republic in 1971 – 2000. *Plant Soil and Environment* **49**, 231-248.
- Duerr B., Gawienowski M., Ropp T., Jacobs T. (1993): MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**, 87 -96.
- Eckey C., Korell M., Leib K., Biedenkopf D., Jansen C., Langen G., Kogel K.H. (2004): Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* **55**, 1 -15.
- Eisenberg D., Marcotte E. M., Xenarios I., Yeates T. (2000): Protein function in the post-genomic era. *Nature* **405**, 823-826.
- Feller U., Anders I., Mae T. (2008): Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1615–1624.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Finnie Ch., Svensson B. (2009): Barley seed proteomics from spots to structures. *Journal of Proteomics* **72**, 315-324.
- Fu S.F., Chou W.C., Huang D.D., Huang H.J. (2002): Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, OsMAPK4, in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiology* **43**; 958–963.
- Gaut B.S. (2002): Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* **154**, 15–28.
- Ghosh D., Xu J. (2014): Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant science* **5**, 1-13.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-3685.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. (1997): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **17**, 9390–9395.
- Hamel L.P. , Nicole M.C., Sritubtim S., Morency M.J., Ellis M., Ehltling J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashih Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B.E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**, 192-198.
- Hanson A.D., Rathinasabapathi B., Rivoal J., Burnet M., Dillon M.O., Gage D.A. (1994): Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 306-310.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A. Zhu J.K., Bohnert H.J. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463-499.
- He C., Fong S.H.T., Yang D., Wang G.L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 1064-1073.
- Herbert B. (1999): Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 660-663.
- Herosimczyk A., Dejeans N., Sayd T., Ozgo M., Skrzypczak W.F., Mazur A. (2006): Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *Journal of physiology and pharmacology* **57**, 81-93.
- Holubová K. (1989): Ječmen - Hordeum L. In: *Rostlinná výroba I - Obiloviny*. Vysoká škola zemědělská Praha, 121–128.
- Horie T., Kaneko T., Sugimoto G., Sasano S., Panda S.K., Shibasaka M., Katsuhara M. (2011): Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulations via

- phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiology* **52**, 663-675.
- Huang A.X., She X.P., Cao B., Zhang B., Mu J., Zhang S.J. (2009): Nitric oxide, actin reorganization and vacuoles change are involved in PEG 6000-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* **136**, 45-56.
- Huang H.J., Fu S.F., Tai Y.H., Chou W.Ch., Huang D.D. (2002): Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive. *Physiologia plantarum* **114**, 572–580.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986): Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plan Physiology* **81**, 802-806.
- Chalupová-Karlovarská V. (2010): Biologie buňky. In: *Obecná biologie*. 2., Nakladatelství Olomouc, s.r.o., ČR, 49-113.
- Cheng Y., Qi Y., Zhu Q., Chen X., Wang N., Zhao X., Chen H., Cui X., Xu L., Zhang W. (2009): New changes in the plasma membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics* **9**, 3100–3114.
- Cheong Y.H., Kim M.C. (2010): Functions of MAPK cascade pathways in plant defense signaling. *Plant Pathology Journal* **26**, 101-109.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Science* **7**, 301-308.
- Ingram J., Bartels D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377–403.
- Jabs T., Dietrich R.A., Dangl J.L. (1996): Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular sepeeroxide. *Science* **273**, 1853–1856.
- JBC Centennial 1905–2005, 100 Years of Biochemistry and Molecular Biology. (2006). The Development of Two-dimensional Electrophoresis by Patrick H. O'Farrell. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 26.
- Jenkins R., Pennington S.R. (2001): Arrays for protein expression profiling: towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics* **1**, 13-29.
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415–424.
- Kalina T., Slavíková Z. (2003): Pletiva a orgány cévnatých rostlin. In: *Nový přehled biologie*. 1st ed. (Rozsypal S. ed.), Scientia, Praha, ČR, 185-225.
- Kalina T., Slavíková Z. (2003): Systém rostlin. In: *Nový přehled biologie*. 1st ed. (Rozsypal S. ed.), Scientia, Praha, ČR, 262-283.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* **60**, 2299–2301.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* **661**, 3-38.
- Kleinhofs A., Graner A. (2001): An integrated map of the barley genome. *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants* **6**, 187-200.
- Klose J., Kobalz U. (1995): Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034-1059.
- Kosová K., Vitamvás P., Prášil I. T., Renaut J. (2011): Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal Proteomics* **74**, 1301–1322.
- Lieberherr D., Thao N.P., Nakashima A., Umemura K., Kawasaki T., Shimamoto K. (2005): A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiology* **138**, 1644 -1652.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Lin C.C., Kao C.H. (2002): Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **37**, 177-184.

- Linhart Y.B., Grant M.C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 237–277.
- Liu Q., Xue Q. (2007): Computational identification and phylogenetic analysis of the MAPK gene family in *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 6–14.
- Lopez M. F. (2000a): Better approach to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation. *Electrophoresis* **21**, 1082-1093.
- Lopez M.F., Kristal B.S., Chernokalskaya E., Lazarev A., Shestopalov A.I., Bogdanova A., Robinson M. (2000): High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* **21**, 3427-3440.
- Lottspeich F. (1999): Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 2476-2492.
- Luan S. (2003): Protein phosphatases in plants. *Annual Review Plant Biology* **54**, 63-92.
- Luo Y., Liu Y.B., Dong Y.X., Gao X.Q., Zhang X.S. (2009): Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment. *Journal of Plant Physiology* **166**, 385-394.
- Maas E.V., Hoffman G.J. (1977): Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division* **103**, 115–34.
- Martinez-Ballesta M.C., Aparicio F., Pallas V., Martinez V., Carvajal M. (2003): Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **160**, 689-697.
- Martinez-Ballesta M.C., Martinez V., Carvajal M.(2000): Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 685-691.
- Matsui N.M., Smith-Beckerman D.M., Epstein L.B. (1999): Methods in Molecular Biology. In: 2-D Proteome Analysis Protocols 112 (Link A.J. ed.), Humana Press, Totowa, kapitola 34.
- Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A. (2004): Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiology* **134**, 118-128.
- Meskauskiene R., Nater M., Goslings D., Kessler F., Camp R., Apel K. (2001): FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12826–12831.
- Morris P.C. (2001): MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytologist* **151**, 67–89.
- Munns R. (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**, 645–663.
- Munns R., Tester, M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339-346.
- Nevalainen O.S. (2003): Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics* **3**, 1936–1946. New York, 35–64.
- Nybohm N. (1955): The pigment characteristics of chlorophyll mutations in barley. *Hereditas* **41**, 483-498.
- O'Farrell P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007–4021.
- Pandey A. a Mann M. (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-846.
- Parker C.E, Warren M.R., Mocanu V. (2010): Mass Spectrometry for Proteomics. In: *Neuroproteomics*. (Alzate O. ed.), CRC Press, Boca Raton, USA,
- Patton W.F. (2000): A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **21**, 1123-1144.
- Peyrano G., Taleisnik E., Quiroga M., de Forchetti S.M., Tigier H.(1997): Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**, 387-393.

- Potáčová A., Čumová J., Hájek R. (2008): Proteomická analýza a její využití ve výzkumu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* **21**, 243-246.
- Quadroni M., James P. (1999): Proteomics and automation. *Electrophoresis* **20**, 664-677.
- Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008): Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 2-18.
- Rabilloud T. (1996): Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* **17**, 813-829.
- Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. (1997): Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 307-316.
- Rabilloud T., Vuillrd L., Gilly C., Lawrence J. J. (1994): Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology* **40**, 57-75.
- Rao K.P., Richa T., Kumar K., Raghuram B., Sinha A.K. (2010): In silico analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA Research* **17**, 1-15.
- Reyna N.S. a Yang Y. (2006): Molecular Analysis of the Rice MAP Kinase Gene Family in Relation to Magnaporthe grisea Infection. *The American Phytopathological Society* **19**, 530-540.
- Righetti P.G., Castagna A., Herbert B., Reymond F., Rossier J.S. (2003): Prefractionation techniques in proteome analysis. *Proteomics* **3**, 1397-1407.
- Roe M.R., Griffin T.J. (2006): Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: Tools for studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics* **6**, 4678-4687.
- Rosengren A.T., Salmi J.M., Aittokallio T., Westerholm J., Lahesmaa R., Nyman T. A., Shi H. Z., Lee B. H., Wu S. J., Zhu J. K. (2003): Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nature Biotechnology* **21**, 81-85.
- Schulte D., Close T.J., Graner A., Langridge P., Matsumoto T., Muehlbauer G., Sato K., Schulman A.H., Waugh R., Wise R.P., Stein N. (2009): The International Barley Sequencing Consortium—At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome. *Plant Physiology* **149**, 1142-1147.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Somssich I.E. (1997): MAPK kinase and plant defence. *Trends Plant Science* **2**, 406 - 408.
- Song F., Goodman R.M. (2002): OsBIMK1, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses. *Planta* **215**; 997-1005.
- Stafstrom J.P., Altschuler M., Anderson D.H. (1993): Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Molecular Biology* **22**, 83-90.
- strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **5**, 307-317.
- Suarez-Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Sultan S.E. (1995): Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* **44**, 363-383.
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on brefeldin A treated Arabidopsis roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *Journal of Proteome Research* **10**, 488-501.
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**, 151 -158.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392-400.

- Thelen J.,(2007): Introduction to Proteomics: a Brief Historical Perspective on Contemporary Approaches. In: Plant Proteomics, (Eckey Ch., ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Tuteja N. (2007): Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymology* **428**, 419–438.
- Urano K., Kurihara Y., Seki M., Shinozaki K. (2010): ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 132–138.
- Uváčková L., Takáč T., Boehm N., Obert B., Šamaj J. (2012): Proteomic and biochemical analysis of maize anthers after cold pretreatment and induction of androgenesis reveals an important role of anti-oxidative enzymes. *Journal of Proteomics* **75**, 1886–1894.
- Vollger M., Lang I., Ovečka M., Lichtscheidl I. (2010): Plasmolysis and cell wall deposition in wheat root hairs under osmotic stress. *Protoplasma* **243**, 51–62.
- Wang H., Li J., Bostock R. M., Gilchrist D. G. (1996): Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* **8**, 375–391.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I. (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090–1094.
- Wen J.Q., Oono K., Imai R. (2002): Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiology* **129**, 1880–1891.
- White S.H., Wimley W.C. (1999): Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **28**, 319–365.
- Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B. (1985): Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical chemistry* **57**, 675–679.
- Wu D., Shen Q., Qiu L., Han Y., Ye L., Jabeen Z., Shu Q., Zhang G. (2014): Identification of proteins associated with ion homeostasis and salt tolerance in barley. *Proteomics* **14**, 1381–1392.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002): Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, 165–183.
- Xiong L., Yang Y. (2003): Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscisic Acid-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *Plant cell* **15**, 745 - 759.
- Yang Z., Ma H., Hong H., Yao W., Xie W., Xiao J., Li X. a Wang S. (2015): Transcriptome-based analysis of mitogen-activated protein kinase cascades in the rice response to *Xanthomonas oryzae* infection. *Rice* **8**, 1–13.
- Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B., Ruiz M. T., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. (2002): Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* **30**, 529–539.
- Yu K., Leufen G., Hunsche M., Noga G., Chen X., Bareth G. (2014): Investigation of Leaf Diseases and Estimation of Chlorophyll Concentration in Seven Barley Varieties Using Fluorescence and Hyperspectral Indices. *Remote sensing* **6**, 64–86.
- Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li H., Zhang Y., Dai S. (2012): Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *Journal of Proteome Research* **11**, 49–67.
- Zhao Q., Zhang H., Wang T., Chen S., Dai S. (2013): Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of Proteomics* **82**, 230–253.
- Zhu J. K. (2001): Plant salt tolerance. *Trends Plant Science* **6**, 66–71.
- Zhu J.K. (2002): Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247–273.
- Zhu J.K. (2003): Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion Plant Biology* **6**, 441–445.
- Zohary D., Hopf M. (2000): The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. In: *Domestication of Plants in the Old World*. 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 316 stran.

7 Seznam použitých zkratk

2-DE – dvourozměrná elektroforéza

APS – peroxodisíran amonný

cv. – odrůda

DTT – dithiothreitol

IEF – isoelektrická fokusace

IPG stripy – proužky s imobilizovaným pH gradientem

MAPK – mitogen - aktivovaná protein kinasa

MAPKK (MAP2K) – mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa

MAPKKK (MAP3K) – mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa

MAPKKKK (MAP4K) – mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa

NO – oxid dusnatý

p – zvolená hladina významnosti

pI – isoelektrický bod

ref – relativní centrifugační zrychlení

ROS – reaktivní formy kyslíku

RP – rehydratační pufr

SDS – dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE – denaturující polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti SDS

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin