

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Zala KOLENC

**FIZIOLOŠKE IN PROTEOMSKE ANALIZE HMELJA
(*Humulus lupulus L.*) V SUŠNEM STRESU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Zala KOLENC

**FIZIOLOŠKE IN PROTEOMSKE ANALIZE SUŠNEGA STRESA PRI
HMELJU (*Humulus lupulus L.*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC ANALYSES OF DROUGHT
STRESS IN HOP (*Humulus lupulus L.*)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2017

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 5.11.2014 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Andreja Čerenak in za somentorja prof. dr. Dominik Vodnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Polona Jamnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Andreja Urbanek Krajnc

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemsko vede

Datum zagovora: 5.6.2017

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Zala KOLENC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 633.791:577.2:581.1:632.112:57.045(043.3)
KG	hmelj/ <i>humulus lupulus</i> /sušni stres/fiziologija rastlin/proteomika
AV	KOLENC, Zala mag. inž. živ.
SA	ČERENAK, Andreja (mentorica)/VODNIK, Dominik (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, področje Biotehnologija
LI	2017
IN	FIZIOLOŠKE IN PROTEOMSKE ANALIZE HMELJA (<i>Humulus lupulus L.</i>) V SUŠNEM STRESU
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 92 str., 22 pregl., 30 sl., 126 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V naravnem okolju se hmelj sooča z različnimi stresnimi dejavniki, med katerimi je suša eden najbolj pogostih in neugodnih. Dve sorte hmelja (Aurora in Savinjski golding) smo izpostavili različnim stopnjam suše in spremljali mehanizme odziva hmelja s fiziološkimi meritvami in proteomsko analizo. Vsebnost vode v substratu se je po 22 dneh zmanjšala s 63 vol. % na 8 vol. % v substratu rastlin hmelja izpostavljenega suši. Posledično so se zaprle listne reže, kar pa je imelo velik vpliv tudi na zmanjšanje fotosinteze (stomatalna inhibicija fotosinteze). Vodna bilanca pri hmelju se je pokazala za zelo stabilno (izohidre rastline), saj so vrednosti relativne vsebnosti vode v listih hmelja padle malo pod 60 % v točki venenja uporabljenega substrata. Proteomska raziskava z metodo 2D-DIGE nam je omogočila identifikacijo 28 od skupno 280 diferencialno izraženih proteinov v suši. Največ identificiranih proteinov je bilo vključenih v procese metabolizma sladkorjev in v proces fotosinteze (njihova vsebnost pa se je s sušo zmanjšala). Identifikacija le-teh proteinov nam kaže, da so bile rastline zaradi suše zelo prizadete in da so njihovi osnovni procesi zelo oslabeli. Identificirali smo tudi proteine metabolizma dušika (glutamin sintetaza), metabolnih poti ROS (laktoilglutation liaz) ter drugih procesov (avksin-vezavni protein). Z raziskavo smo pridobili nova znanja o odzivu hmelja na sušo.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dd
DC	UDK 633.791:577.2:581.1:632.112:57.045(043.3)
CX	hop/ <i>humulus lupulus</i> /drought stress/plant physiology/proteomics
AU	KOLENC, Zala
AA	ČERENAK, Andreja (supervisor)/VODNIK, Dominik (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field Biotechnology
PY	2017
TI	PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC ANALYSES OF DROUGHT STRESS IN HOP (<i>Humulus lupulus L.</i>)
DT	Doctoral dissertation
NO	XI, 92 p., 22 tab., 30 fig., 126 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In natural environment, hop plants have to cope with different constraints, among which the drought is one of the most frequent and challenging. Two cultivars (Aurora and Savinjski golding) were exposed to different drought stages and the hop response mechanisms were observed with physiological measurements and proteomic analysis. Soil water content decreased from 63 vol. % to 8 vol. % in substrate of hop plants exposed to drought stress. Consequently, the stomata were closed with major impact on the decrease of photosynthesis (stomatal inhibiton of photosynthesis). Hop water balance was determined to be very stable (isohydric plants), because the relative water content values in leaves fell slightly below 60 % in the wilting point of the used substrate. Proteomic research with 2D-DIGE method enabled us the identification of 28 out of 280 differentially expressed proteins. The most identified proteins were included in processes of sugar metabolism and photosynthesis (their content decreased). The identification of these proteins shows us a general decrease of plant fitness and that their basic processes were weakened. We also identified the proteins included in nitrogen metabolism (glutamine synthetase), reactive oxygen related pathways (lactoylglutathione lyase) and other processes (auxin-binding protein). With our research we obtained new knowledge about hop response mechanisms to drought stress.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HMELJ	3
2.1.1 Pomen vode za rast hmelja	4
2.1.2 Namakanje hmelja	5
2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES	6
2.2.1 Vpliv suše na vodno bilanco rastline	9
2.2.2 Zapiranje listnih rež	10
2.2.3 Omejeno delovanje fotosinteze	11
2.2.4 Osmotska prilagoditev rastlin	13
2.2.5 Oksidativni stres	13
2.3 PROTEOMSKE RAZISKAVE SUŠNEGA STRESA PRI RASTLINAH	14
2.4 SUŠNI STRES PRI HMELJU	19
3 MATERIAL IN METODE DELA	23
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	23
3.2 POTEK POSKUSA	24
3.3 PRIPRAVA RASTLIN	25
3.3.1 Gojišča za razmnoževanje in ukoreninjenje hmelja	25
3.3.2 Aklimatizacija rastlin hmelja	26
3.4 TRETIRANJE RASTLIN	27
3.5 FIZIOLOŠKE MERITVE RASTLIN IN SUBSTRATA	31
3.5.1 Vsebnost vode v substratu	31
3.5.2 Določanje vodnega statusa rastline	31
3.5.3 Meritve fizioloških parametrov	31
3.5.4 Statistična analiza podatkov fizioloških parametrov	32

3.5.5 Izbor rastlin za proteomske raziskave	33
3.6 PROTEOMSKA ANALIZA	33
3.6.1 Ekstrakcija proteinov	33
3.6.2 Označevanje proteinov za 2D-DIGE analizo	35
3.6.3 Izoelektrično fokusiranje	35
3.6.4 Uravnoteženje	36
3.6.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti Na-dodecil sulfata	37
3.6.6 Preparativna elektroforeza	37
3.6.7 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	39
3.6.8 Bioinformatska analiza podatkov masnega spektra	40
4 REZULTATI	41
4.1 RAZMERE V RASTLINJAKU TER VODNO RETENZIJSKE LASTNOSTI SUBSTRATA	41
4.2 VSEBNOST VODE V SUBSTRATU	42
4.3 VIZUALNI IZGLED RASTLIN IN MORFOLOŠKI PARAMETRI	44
4.4 REZULTATI MERITEV FIZIOLOŠKIH PARAMETROV	46
4.5 PROTEOMSKA ANALIZA LISTOV HMELJA V SUŠNEM STRESU	55
4.6 DOLOČITEV FUNKCIJE IDENTIFICIRANIH PROTEINSKIH LIS	62
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	66
5.1 RAZPRAVA	66
5.1.1 Fiziološki odziv	68
5.1.2 Odziv na ravni proteoma	69
5.1.2.1 Proteini udeleženi v procesu metabolizma sladkorjev	71
5.1.2.2 Proteini udeleženi v procesu fotosinteze	73
5.1.2.3 Proteini udeleženi v procesu metabolizma dušika	74
5.1.2.4 Protein povezan z metabolnimi potmi ROS	75
5.1.2.5 Proteini udeleženi v raznih procesih	76
5.2 SKLEPI	77
6 POVZETEK (SUMMARY)	79
6.1 POVZETEK	79
6.2 SUMMARY	81
7 VIRI	83
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Različni odzivi rastlin na sušno ter glavni mehanizmi, ki jih vključujejo.....	8
Preglednica 2: Pregled nekaterih proteomske raziskav sušnega stresa	17
Preglednica 3: Priprava raztopine 10-% (v/v) TCA v acetonu.....	33
Preglednica 4: Priprava raztopine (80 -% (v/v) metanol; 0,1 M amonijev acetat).....	34
Preglednica 5: Priprava raztopine raztopine (80-% (v/v) aceton).	34
Preglednica 6: Priprava pufra SDS.....	34
Preglednica 7: Priprava raztopine (100-% metanol; 0,1 M amonijev acetat).....	34
Preglednica 8: Priprava pufra DIGE.....	34
Preglednica 9: Priprava 10 mM lizina.	35
Preglednica 10: Priprava 2x vzorčnega pufra.....	35
Preglednica 11: Priprava rehidracijskega pufra z DeStreak reagentom.	36
Preglednica 12: Priprava pufra za uravnoveženje 1.	36
Preglednica 13: Priprava pufra za uravnoveženje 2.	37
Preglednica 14: Priprava 12,5 % poliakrilamidnega gela za 2D elektroforezo.....	37
Preglednica 15: Priprava "BindSilane" raztopine za fiksacijo.	38
Preglednica 16: Raztopina za fiksacijo preparativnega gela.	38
Preglednica 17: Raztopina za predinkubacijo.	39
Preglednica 16: Vsebnost vode v substratu (SWC) med poskusom. N = 8, sd = standardna deviacija.....	43
Preglednica 17: Relativna vsebnost vode (RWC) v listih hmelja. N = 8, sd = standardna deviacija.....	47
Preglednica 18: Povprečne vrednosti za g_s , E in A_n s 95 % intervalom zaupanja (IZ) za vsak SWC razred posebej (za obe sorte skupaj).	51
Preglednica 19: Stopnja stresa glede na dan vzorčenja rastlin ter SWC vrednost za rastline hmelja, vključene v proteomsko analizo.....	56
Preglednica 20: Koncentracije proteinov v vzorcih listov hmelja po ekstrakciji proteinov.	56
Preglednica 21: Identifikacija proteinov po analizi MALDI TOF/TOF v dveh sortah hmelja.	60
Preglednica 22: Identificirani proteini v listih hmelja s statistično značilno spremenjeno vsebnostjo proteinskih lis.	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizmi odziva rastline na sušo, ki povzročajo zmanjšano aktivnost fotosinteze (Farooq in sod., 2012).	12
Slika 2: Vodna bilanca hmelja ter njeno uravnavanje (Kolenc in sod., 2014).	21
Slika 3: Shema poteka poskusa.	24
Slika 4: Rastlinski material v tkivni kulturi v času rasti.	25
Slika 5: Primer optimalne ukoreninjenosti <i>in vitro</i> vzgojenih rastlin pred presaditvijo v šotne tabletke (v <i>in vivo</i> razmere).	26
Slika 6: Rastline v fazi aklimatizacije v šotnih tabletkah, ob pričetku zalivanja preko korenin.	27
Slika 7: Vodno retencijska krivulja substrata, ki smo ga uporabili v poskusu.	28
Slika 8: Rastline hmelja z razvitimi 10 listi ob pričetku tretiranja.	30
Slika 9: Primeri listov posamezne rastline vseh štirih obravnavanj, 22 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu za določitev listne površine (LA).	32
Slika 10: Rastline hmelja po aklimatizaciji v rastlinjaku. Na sliki sta z rdečim krogcem označena merilnika vlage in temperature v rastlinjaku.	41
Slika 11: Povprečna dnevna temperatura ter povprečna dnevna relativna vlaga v rastlinjaku. Rdeče označena okvirčka prikazujeta čas od začetka do konca vzorčenja.	42
Slika 12: SWC vrednosti, prikazane s povprečji in standardnimi napakami (N=8).	44
Slika 13: Rastlina hmelja izpostavljena sušnemu stresu (levo) in v kontrolnih razmerah (desno), sorta Aurora; 11 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu.	45
Slika 14: Rastlina hmelja izpostavljena sušnemu stresu (levo) in kontrolnih razmerah (desno), sorta Savinjski golding; 11 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu.	45
Slika 15: Listna površina (LA) za sorte Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Podatki so prikazanani z okvirji z ročaji.	46
Slika 16: RWC vrednosti prikazane s povprečji in standardnimi napakami (N=8).	48
Slika 17: Stomatalna prevodnost (g _s) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.	49
Slika 18: Transpiracija (E) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.	50
Slika 19: Neto fotosinteza (A _N) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.	51
Slika 20: Hitrost toka elektronov (ETR) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.	52

Slika 21: Fotokemična učikovitost (yield; Fv'/Fm') kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC ($> 30\%$, $20\text{-}30\%$, $10\text{-}20\%$ in $< 10\%$). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.....	52
Slika 22: Graf odvisnosti A_n od g_s	53
Slika 23: Graf odvisnosti A_n od ETR.....	54
Slika 24: Graf odvisnosti A_n od Fv'/Fm	54
Slika 25: Učinkovitost izrabe vode (WUE) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC ($> 30\%$, $20\text{-}30\%$, $10\text{-}20\%$ in $< 10\%$). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.....	55
Slika 26: Venov diagram pri blagem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVO, $p<0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno...	57
Slika 27: Venov diagram pri zmernem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVO, $p<0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno...	58
Slika 28: Venov diagram pri močnem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVO, $p<0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno...	58
Slika 29: Preparativni gel z označenimi proteinskimi lisami, ki smo jih analizirani na MS....	59
Slika 30: Tortni diagram s funkcionalno razporeditvijo identificiranih proteinov.	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D-DIGE	dvodimenzionalna diferenčna elektroforeza
2D-PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamidna elektroforeza
ABA	abscizinska kislina
Alanin	aminotransferaza AlaAT
A _n	neto fotosinteza
APS	amonijev persulfat
APX	askorbat peroksidaza
AU	sorta Aurora
ATP	adenozintrifosfat
BAP	benzilaminopurin
C	rastline hmelja v kontrolnih razmerah
CAT	katalaza
CBB	coomassie brilliant blue
C _i	znotrajcelična koncentracija CO ₂
CHAPS	3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat
D	suši izpostavljenje rastline hmelja
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSS	čas po izpostavljenosti sušnemu stresu
DTT	ditiotreitol
E	transpiracija
ESI	elektrosprej ionizacija
EST	oznaka izraženega zaporedja (ang. expressed sequence tag)
ETR	hitrost pretoka elektronov
FBPaza	fruktoze-1,6-bisfosfataza
Fv`/Fm`	fotokemična učinkovitost
GA	giberelinska kislina
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
GR	glutation reduktaza
g _s	stomatalna prevodnost
GS	glutamin sintetaza
GSH	glutation
GSSH	glutation disulfid
HSP	protein vročinskega šoka
IAA	indol-3-ojetna kislina
IBA	indol-3-butirična kislina
LA	listna površina
LC	tekočinska kromatografija
LC-MS	tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo

LGL	laktoilglutation liaza
LEA	proteini pozne embriogeneze
LSC	specifično prevodnost listov
MALDI	ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z laserjem
MDAR	monodehidroaskrobat reduktaza
MDH	malat dehidrogenaza
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
M_w	molekulska masa
NADP-ME	NADP- malatnega encima
NDVI	normalizirana vrednost vegetacijskega indeksa
OEC	kompleks za oksidacijo vode
pI	izoelektrična točka
POD	peroksidaza
PEPCaza	fosfoenolpiruvat karboksilaza
PGK	fosfoglicerat kinaza
PPDK	piruvat ortofosfataza
PRK	fosforibulokinazo
RBP	RNA vezavni protein
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
Rubisko	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
RWC	relativna vsebnost vode
SDS	natrijev dodecil sulfat
SG	sorta Savinjski golding
SHMT	serin hidrometil transferaza
SOD	superoksid dismutaza
SWC	vsebnost vode v substratu
TCA	triklorocetna kislina
TEMED	tetrametiletilendiamin
TOF	masni detektor na čas preleta ionov
TRAP	celokupna antioksidativna aktivnost
v/v	ml/100 ml
w/v	g/100 ml
WUE	učinkovitost izrabe vode
Ψ	vodni potencial
Ψ_s	osmotski potencial
Ψ_p	potencial tlaka

1 UVOD

Kmetijske rastline, kamor uvrščamo tudi hmelj, so izpostavljene več okoljskim stresnim dejavnikom, ki vplivajo na rast in razvoj rastline in posledično tudi na kakovost in količino pridelka. Suša se šteje za enega najbolj uničajočih, saj zmanjšuje pridelek v večjem obsegu kot drugi stresni dejavniki (Lambers in sod., 2008). Pojav suše je zelo nepredvidljiv, saj je odvisen od več dejavnikov kot so količina in pogostost padavin, zadrževanja vode v tleh in izhlapevanja (Farooq in sod., 2009; Mishra in Singh, 2010). Na globalni ravni je sušni stres, predvsem v kombinaciji z visokimi temperaturami in radiacijo, med najpomembnejšimi omejitvami za velik pridelek kmetijskih rastlin (Chaves in sod., 2003). V zadnjih desetletjih se povečuje povprečna temperatura zraka v kombinaciji s spremembami v hidrološkem ciklu, kar se odraža v postopnem zmanjševanju razpoložljivosti vode. Predvidevajo tudi povečanje števila ter resnosti sušnih obdobjij (IPCC, 2013). Zaradi pomanjkanja padavin in njihove neugodne časovne (sezonske) razporeditve je pogostost in intenzivnost suš povečana, s tem pa se povečuje tveganje kmetijske pridelave. To tveganje lahko omejimo z namakanjem. Ta tehnološki ukrep se uporablja tudi pri pridelavi hmelja (Knapič in Čremožnik, 2012; Neve, 1991). Zaradi namakanja je kmetijstvo največji porabnik vodnih virov v večini regij po svetu, voda pa bo v prihodnosti postala redkejša in dražja dobrina. Ravno zaradi tega je razumevanje učinkov sušnega stresa pri kmetijskih rastlinah ter vključevanje teh znanj v žlahtnitelske programe pomembno, saj omogoča potrebne prilagoditve za pridelavo v stresnih razmerah z večjo možnostjo preživetja rastlin z večjim ter kakovostnejšim pridelkom (Chaves in sod., 2003).

Vpliv pomanjkanja vode pri hmelju je kljub vedno večji problematiki suše malo raziskan. V primerjavi z nekaterimi drugimi kmetijskimi rastlinami je bilo pri hmelju, tako v svetu kot tudi pri nas, narejenih manj raziskav o vplivu pomanjkanja vode na rast in razvoj. Kljub velikemu gospodarskemu pomenu te poljščine za območja pridelave, je hmelj v globalnem smislu manj pomembna kmetijska rastlina, ki se v svetu prideluje na okrog 50.000 ha (IHGC, poročilo ekonomske komisije 2016). Hmelj je nepogrešljiva rastlina predvsem v pivovarski industriji in zelo uporabna tudi za izdelavo farmacevtskih izdelkov. V svetovnem merilu zaseda Slovenija 6. mesto s skoraj 3 % površin zasajenih s hmeljem. Ker 99 % hmelja izvozimo, le-ta predstavlja pomemben kmetijski pridelek.

Abiotski stres pri hmelju je v primerjavi z biotskim stresom veliko manj raziskan. O hmelju, izpostavljenemu sušnemu stresu, je objavljenih nekaj raziskav predvsem z vidika morfološko-anatomskih prilagoditev (Gloser in sod., 2011, 2013; Jupa in sod., 2013, 2016), pa tudi nekaj raziskav o spremenjenem metabolizmu hmelja v sušnem stresu (Čeh in sod., 2009; Čerenak in sod., 2010; Korovetska in sod., 2014, 2015; Majer, 2000b).

Pri odzivu rastline na neugodne razmere v okolju se sprožijo različni fiziološki mehanizmi, ki vključujejo spremenjeno izražanje genov in posledično spremembe v vsebnosti določenih

proteinov. Spremembe v izražanju proteinov imajo pomembno vlogo v odgovoru rastlin na sušni stres. S proteomsko analizo je mogoče določiti vsebnost in identiteto proteinov, ki so vključeni v odziv rastlin na stresne razmere (Mohammadi in sod., 2012). Kombinacija omskih pristopov (transkriptomika, proteomika) ter konvencionalnih fizioloških tehnik (meritve izmenjave plinov, fluorescence, meritve vodnega potenciala) nam omogoča boljši vpogled v odgovor rastlin na sušni stres. Tako pridobljena znanja imajo velik pomen v žlahtniteljskih programih pri pridobivanju novih sort z izboljšano toleranco na sušni stres.

Natančneje mehanizmi odziva hmelja na sušo še niso pojasnjeni, zato so potrebne nadaljnje raziskave ter nadgradnja znanja, kar bi nam pomagalo tudi pri razumevanju tolerance sušnega stresa.

Cilji doktorske naloge so:

- raziskati kako se hmelj odziva na sušni stres s prevodnostjo listnih rež, fotosintezo ter fotokemično učinkovitostjo;
- raziskati razlike med sortama hmelja Aurora in Savinjski golding v odzivu na sušni stres
- raziskati razlike v izražanju proteinov v listih hmelja izpostavljenega sušnemu stresu v primerjavi z optimalno zalitimi
- identificirati proteine, ki imajo pomembno vlogo pri odzivu hmelja na sušni stres
- povezati rezultate proteinske slike in fizioloških meritev

Raziskovalne hipoteze so:

- (H1) se hmelj na pomanjkanje vode odziva z omejevanjem prevodnosti listnih rež, kar vodi v zmanjšano fotosintezo, ob resnejšem sušnem stresu pa se zmanjša tudi fotokemična učinkovitost. Pričakujemo, da se bo ta odziv pri dveh različnih sortah hmelja ob enaki stopnji suše različno izrazil;
- (H2) se ob pomanjkanju vode spremeni proteinski profil v listih. Predvidevamo, da se zaradi sušnega stresa sintetizirajo proteini, ki imajo neposredno vlogo pri odzivu rastline na stres;
- (H3) so pri hmelju ob suši prisotni proteini, ki so pomembni pri uravnavanju vodne bilance rastline ob majhni razpoložljivosti vode in proteini, ki so pomembni pri obrambi pred sekundarnim, oksidativnim stresom;
- (H4) bo proteinsko sliko hmelja v sušnem stresu moč povezati z rezultati fizioloških meritev. Pričakujemo, da bo potek procesov kot sta fotosinteza in transpiracija v sušnih razmerah manj prizadet v rastlinah, ki bodo imele na proteinskem nivoju močneje izražene mehanizme prilagoditve na stres.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ

Hmelj (*Humulus lupulus L.*) je gojena rastlina, ki jo botanično uvrščamo v red koprivovcev (Urticales), kamor spadata tudi navadna kopriva ter navadna konoplja, in skupaj spadajo v družino konopljevk (Cannabaceae) (Martinčič, 1984). V rod *Humulus* spadajo tri vrste in sicer *H. lupulus L.*, *H. japonicus* Sieb. et Zucc. in *H. yunnanensis* (Small, 1978). Predlagana je bila klasifikacija divjega hmelja na 5 varietet, in sicer var. *neomexicanus* v severozahodni Ameriki, var. *pubescens* v srednje zahodni Ameriki, var. *lupuloides* v vzhodni Ameriki ter var. *lupulus* za evropski divji ter gojeni hmelj, var. *cordiflorus* za japonski divji hmelj (Neve, 1991). Varietete se med seboj razlikujejo po morfoloških lastnostih kot so oblika listov, število krp lista in trihom. Severno ameriški ter japonski divji hmelj sta si morfološko podobna, kar nakazuje na genetsko podobnost, po drugi strani pa se popolnoma razlikujeta od evropskega hmelja (Neve, 1991; Murakami in sod., 2006).

Hmelj je trajnica ter ovijalka, ki se ovija okoli opore v smeri urinega kazalca s pomočjo stebelnih trihomov (Neve, 1991). Podzemni deli hmelja so sestavljeni iz koreninskega tkiva in tkiva stebla, ki skupaj tvorita koreniko ali tako imenovan štor. Glavno vlogo sprejemanja vode in hrani imajo vlaknaste korenine, ki tvorijo koreninsko grudo 20 do 30 cm v globino. Po drugi strani se nadomestne korenine (ali adventivne korenine) razpredajo tik pod površino. Nadzemni deli so enoletni in pričnejo spomladis odganjati iz korenike, ki je trajni podzemni del stebla. Razvijejo se iz brstičev na stebelnem tkivu, na katerem je veliko očesc, le-ta spomladis pričnejo poganjati. Hmeljno steblo imenujemo trta, iz katere se razvijejo listi, zalistniki in kompleksna socvetja. Trta se oporo ovija z oprijemalnimi trihomi in zraste do 12 metrov visoko, zaradi česar je gojena v tako imenovani žičnici. Zalistniki se razvijejo iz rastnih vršičkov med listom in stebлом na vsakem nodiju stebla. Listi so na steblu iz stranskih poganjkih razporejeni navzkrižno. Starejši listi so trikrpati ali petkrpati in so tako široki kot so dolgi (Wagner, 1983).

Hmelj je dvodomna rastlina, v nasadih pa so ekonomsko pomembne le ženske rastline, ki se od moških rastlin ločijo šele po generativnih organih (cvetovih). Moški cvetovi so majhni, združeni v grozdasta socvetja na zgornjih zalistnikih moške rastline. Ženski cvetovi so združeni v socvetje, katerega osnovno sestavlja vretence z nodiji. Na vsakem nodiju je par krovnih lističev in par prilistov. Na dnu krovnih listkov in prilistkov se razvijejo lupulinske žlez, v katerih se nakopičijo eterično olje, grenčične smole in čreslovine. Osemenjeni ženski cvetovi v nasadih niso zaželeni, saj zmanjšujejo kakovost pridelka, so manj zbiti in imajo manj lupulinskih žlez, zaradi česar so tudi manj obstojni (Ferant, 2012). Glavni pridelek pridelave hmelja so storžki. Storžek je dozorelo žensko socvetje in je gospodarsko najpomembnejši del rastline hmelja, saj vsebujejo lupulin. V lupulinskih žlezah ženskega socvetja se izločajo aktivne aromatične snovi, ki so najpomembnejše za pivovarsko

industrijo. Le te aktivne snovi sodijo v tri glavne skupine: hmeljne smole, eterična olja ter polifenolne spojine (Ferant in Košir, 2012; Zupanec, 1991). Hmeljne smole delimo na mehke in trde. Mehke smole so sestavljene iz alfa-kislin, beta-kislin in neokarakteriziranih mehkih smol. Alfa-kisline dajejo glavno grenčično aroma pivu v svoji izomerni obliki, saj se v procesu izomerizacije pretvorijo v izoalfa-kisline, zaradi česar so v pivu bolje topne. Po drugi strani pa so beta-kisline zelo netopne v pivu in zato je njihov prispevek h grenkemu okusu v pivu manjši. S staranjem in skladiščenjem se zaradi procesov oksidacije in polimerizacije zelo zmanjša pivovarska vrednost hmelja, saj se zmanjša vsebnost alfa-kislin. (Neve, 1991; Ferant in Košir, 2012). Eterična olja so kompleksna mešanica več kot 300 komponent, ki dajejo pivu aroma in okus. So hlapna, zato se med procesiranjem njihova vsebnost zmanjšuje ali pa pride do oksidacije sestavin olja, kar povzroča neprijeten vonj (Neve, 1991; Ferant in Košir, 2012). Najpogostejše komponente eteričnega olja so mircen, alfa-humulen ter beta-kariofilen, ki skupaj predstavljajo 90 % eteričnega olja, ostalih 10 % pa sestavljajo produkti ogljikovodikov in ostale sestavine hmelja (Košir, 1995). Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije je bila razvita metoda, ki na podlagi 31 komponent eteričnega olja razdeli 95 svetovnih sort v 14 oljnih skupin (Kralj in sod., 1991).

Hmeljni polifenoli so v pivu pomembni predvsem zaradi vpliva na aroma, barvo, okus, peno ter stabilnost okusa in grenčice, pa tudi zaradi njihove vezave na proteine, ki jih kasneje oborijo. Kljub vsemu ima lahko prevelika količina polifenolov negativen vpliv kot sta povečana motnost piva ali sprememba okusa (Košir, 1995). Donko in sod. (2003) opisujejo več vrst polifenolov, izmed katerih je ksantohumol zaradi močnega antioksidativnega potenciala med najpomembnejšimi. Donko in sod. (2003) so ugotovili, da imajo ti polifenoli antikancerogene, antimikrobne, antioksidativne in antimutagene učinke, poleg tega pa učinkujejo proti boleznim ožilja, osteoporosi, vnetjem ter visokemu tlaku.

2.1.1 Pomen vode za rast hmelja

Pomanjkanje vode je eden izmed omejujočih okoljskih dejavnikov, ki zavirajo rast in razvoj rastlin hmelja z velikimi posledicami na pridelek (Majer, 2000a; Glosar in sod., 2011). Poskusi z namakanjem v preteklosti so pokazali, da namakanje dvigne pridelek hmelja za približno 15 %, v ekstremno sušnih letih pa tudi do 100 % (Čremožnik in sod., 2008). Po drugi strani pa Svoboda in sod. (2008) navajajo 21 % povečanje pridelka pri namakanih rastlinah v primerjavi z ne-namakanimi. Kot je bilo pričakovano je Majerjeva (2000a) v raziskavi med drugim dokazala, da je količina pridelka v namakanih parcelah značilno večja kot na pokritih (brez vode) ali pa nenamakanih (prepuščenim padavinam) parcelah. Naglič in sod., (2016) povzemajo, da rastlina hmelja potrebuje 300 do 500 l vode za kilogram pridelane suhe snovi, oziroma da potrebuje 500 do 700 mm vode v rastni sezoni za uspešno rast. V rastni sezoni naj bi hmelj dobil vsaj 300 do 600 mm padavin oziroma vsaj ne manj kot 450 mm.

V zvezi z učinki suše in učinki namakanja je bilo poleg količine pridelka veliko pozornosti posvečene kvaliteti pridelka. Ugotovili so, da sušni stres nima statistično značilnega vpliva na vsebnost alfa kislin, se pa nakazuje njihovo zmanjšanje. Svoboda in sod. (2008) pa so dokazali 7 % višjo vsebnost alfa-kislin v namakanih parcelah glede na ne-namakane. Pomanjkanje vode se pri hmelju kaže tudi v neenakomerni velikosti storžkov ter njihovem neenakomernem dozorevanju in pa manjši količini lupulina (Majer, 2000a). Majerjeva (1997) je ugotovila, da je v storžkih hmelja z namakanimi parcelami manj mircena in več farnesena, humulena, kariofilena ter geraniola v primerjavi s pokritimi in nenamakanimi parcelami. Prav tako se je pričakovano pokazal vpliv sušnega stresa na količino eteričnih olj (Majer, 1995, 1997, 1999).

2.1.2 Namakanje hmelja

Pomanjkanje vode je razlog za zmanjšano količino in kakovost pridelka. To tveganje lahko omejimo z namakanjem, ki je tehnološki ukrep in se uporablja pri pridelavi hmelja (Knapič in Čremožnik, 2012; Neve, 1991). Raziskave kažejo, da je namakanje eden od ukrepov, ki je tudi ekonomsko upravičen, saj večji in bolj kakovosten pridelek upraviči stroške namakanja hmelja (Majer, 1995).

Poznavanje evapotranspiracije in vodne bilance rastline je bistvenega pomena za pravilno izvedeno namakanje. Izgube vode s tal z izhlapevanjem (evaporacija) skupaj s procesom transpiracije imenujemo evapotranspiracija. Vodna bilanca je razlika med sprejeto vodo ter transpiracijo. Vodna bilanca rastline je negativna, kadar je sprejem vode v rastlino manjši od transpiracije in obratno (Larcher, 2003). Parametra, ki prikazujeta vodno bilanco rastline sta vsebnost vode ter energijski status vode. Vsebnost vode se izraža kot relativna vsebnost vode v rastlini (RWC, angl. relative water content), energijski status se običajno izraža kot vodni potencial (Ψ) (Turner, 1981). K skupnemu vodnemu potencialu prispeva več komponent, in sicer: potenciala tlaka (Ψ_p), osmotskega potenciala (Ψ_s), gravitacijskega potenciala (Ψ_g) in potenciala matriksa (Ψ_m). Potencial tlaka imenujemo turgor, gre za hidrostatski tlak v celicah, ki je posledica sprejema vode zaradi razlik vodnem potencialu med celico in njenim okoljem. Negativen hidrostatski tlak pa je pomemben za transport vode pri višjih razdaljah (tenzija v ksilemu). Osmotski potencial je posledica prisotnosti topljencev v celici. Vezava vode na te topljence zmanjša razpoložljivost vode, kar se odraža v negativni vrednosti Ψ_s . Gravitacijski potencial označuje potencialno energijo vode če je glede na referenčno stanje dvignjena na neko višino. Kot zadnja komponenta vodnega potenciala je potencial matriksa, ki je posledica interakcij med molekulami vode in netopnimi strukturami v celici, kar zmanjšuje razpoložljivost vode v rastlini (Hopkins in Hüner, 2008; Vodnik, 2012).

Za namakanje je pomembno poznavanje dostopnosti vode rastlinam. V tleh je rastlinam dostopna tista voda, ki je vezana s silo med točko venenja in poljsko kapaciteto. Točka venenja označuje stanje, ko je voda v tleh vezana s takšno silo, da je večini rastlinam nedostopna in zato rastline ne morejo vzpostaviti pozitivne vodne bilance ter pričnejo veneti. Dogovorno točka venenja ustreza tenziji (matričnemu potencialu tal) -0,15 bar oz. 1,5 MPa, vendar je potrebno vedeti, da na sušo prilagojene rastline prenesejo večjo tenzijo vode v tleh. Poljska kapaciteta je stanje ko iz tal oz. substrata odteče vsa gravitacijska voda (dogovorjeno je, da gre za povprečno silo 0,33 bar) (Knapič in Čremožnik, 2012). Pri hmelju poznamo dve vrsti tehnologij za namakanje, namakanje z bobnastimi namakalniki ter kapljično namakanje v različnih oblikah. Pri obeh vrstah namakanja je pomembno, da z upoštevanjem vodno zadrževalnih lastnosti tal optimalno namakamo tla. Z bobnastimi namakalniki lahko dodamo na hektar od 20 do 30 mm vode, vendar je ta tehnologija nekoliko zahtevnejša s tehničnega vidika, poleg tega pa ima nekaj slabosti in sicer, da lahko rastline poškoduje, zahteva večje količine energije (električne energije ter gorivo), poveča možnost izpiranja tal (Knapič in Čremožnik, 2012). Po drugi strani pa kapljično namakanje omogoča bolj optimalno rabo vode (izgube vode pri kapljičnem namakanju so ocenjene na 8 %, pri namakanju z bobnastimi namakalniki pa na 30 - 40 %). V splošnem sta Naglič in Pintar (2013) ugotovila, da je kapljično namakanje veliko bolj varčno v primerjavi z uporabo bobnastih namakalnikov. Pri kapljičnem namakanju poznamo več različnih sistemov v hmeljarstvu, in sicer: podzemni kapljični sistem, kapljični sistem na vrhu žičnice in sistem, kjer so namakalne cevi v vrsti s hmeljem. Pri kapljičnem namakanju se določa količina in frekvenca namakanja na osnovi ocene dnevne evapotranspiracije, ki se kontrolira z merjenjem vlage v tleh. Poleg merjenja vlage v tleh za določitev pravilne ocene evapotranspiracije je pomembno tudi, da se vlaga spremlja na dveh globinah, saj je aktivni sloj korenin hmelja na globini 20 do 60 cm (Knapič in Čremožnik, 2012; Naglič in sod., 2016).

V Sloveniji imamo nekje 60 % hmeljišč z možnostjo namakanja (bodisi z rolomati ali s kapljičnimi namakalniki). Na Inštitutu za hmeljarstvo in piovarstvo Slovenije napoved namakanja za hmelj izvajamo le za namakanje z rolomati. V ta namen v treh različnih (kontrastnih) tipih tal spremljamo vlago na dveh globinah in sicer na 20 in 40 cm. Vlago določamo gravimetrično s standardno metodo. Priporočilo namakanja se izda, ko na globini 40 cm odstotek vlage pade pod 50 % razpoložljive vode v tleh. Kako se hmelj odziva na pomanjkanje vode, ima tako velik pomen tudi pri načrtovanju namakanja.

2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES

Stalen pretok energije je nujno potreben v vseh organizmih za vzdrževanje svoje značilne strukture in organizacije, da ima organizem možnost rasti in razmnoževanja. Takšno stanje imenujemo homeostaza. Kakršne koli spremembe v okolici lahko porušijo homeostazo oz.

ravnovesje organizma. Stres rastlin lahko razložimo kot negativen vpliv na fiziološko stanje rastline, ki povzroči nenaden prehod iz optimalnih na neoptimalne pogoje in ovira začetno homeostatsko stanje rastline (Hopkins in Hüner, 2008). Po drugi strani pa je stres v agronomskem pomenu definiran kot pojav, ki zmanjša pridelek ali biomaso rastlin. Rastline so pogosto izpostavljene različnim stresnim dejavnikom, ki so lahko biotski ali abiotski. Med abiotske stresne dejavnike uvrščamo svetlobno sevanje (pomanjkanje ali presežek svetlobe v vidnem delu spektra, presežek UV sevanja), temperatura (toplo, hladno, zmrzal), voda (suh zrak, suha tla, poplave), plini (pomanjkanje kisika, vulkanski plini, plinska onesnažila antropogenega izvora), minerali (pomanjkanje ali presežek mineralov, neravnovesje, slanost, težke kovine, kislost ali alkalnost), mehanski učinki (veter, snežna odeja, ledeniki) (Larcher, 2003). Biotski stres lahko povzročajo rastline (parazitske rastline, alelopatija), mikroorganizmi (virusi, bakterije, glive), živali (paša, teptanje), antropogeni vplivi (onesnaževanje, uporaba fitofarmacevtskih sredstev, zbijanje tal, ogenj, ionizirajoče sevanje, elektromagnetno valovanje).

O sušnem stresu rastlin govorimo, kadar je v določenem stanju manjša razpoložljivost vode bodisi zaradi sušnih tal, visoke evaporacije, osmotske vezave vode v slanih ali zmrznjenih tleh. Učinki suše na rastline so predvsem odvisni od intenzitete in trajanja izpostavljenosti rastline suši (Farooq in sod., 2012). Odziv rastlin na sušo je zelo kompleksen in se razlikuje med vrstami in sortami. Vendar sta vsem skupna dva glavna mehanizma, ki rastlinam pomagata preživeti in to sta izogib stresu ter toleranca stresa (Chaves in sod., 2009; Kosová in sod., 2011). Mehanizem izogiba stresu omogoča rastlinam vzdrževati vsebnost vode kljub sušenju tal in zraka. To rastline dosežejo tako, da izboljšajo sprejem vode iz tal v rastlino, da omejijo izgube vode s transpiracijo, da vodo bolj učinkovito izrabljajo ali vodo shranjujejo. K temu prispevajo predvsem morfološko-anatomske prilagoditve, kot so zmanjšana listna površina in povečana globina, širina ter gostota korenin. Pomembno vlogo ob zmanjšani prevodnosti listnih rež v sušnem stresu ima tudi uporaba vode shranjene v steblu ali koreninah, ki se v sušnih pogojih prenese v liste rastline. Toleranca rastline na sušni stres je drugi možni odziv. Gre za zmožnost rastline, da pri nizkem vodnem potencialu normalno vzdržuje celične funkcije. Rastline z visoko toleranco sušnega stresa lahko preživijo ekstremne razmere zaradi prehoda v anabiotsko stanje, ob katerem je aktivnost metabolizem rastline zmanjšana. Če pa se stopnja sušnega stresa prične povečevati, celice pričnejo tvoriti nove proteine in stresne metabolite, kot so prolin, rafinoza, trehaloza ali pa te omenjene metabolite sprostijo iz drugih celic. Poveča se izražanje genov, ki kodirajo stresne proteine, kot sta dehidrin in osmotin. Ti proteini ščitijo makromolekule v citoplazmi in jedru pred denaturacijo in popolnim uničenjem. Ob ponovni razpoložljivosti vode te rastline ponovno aktivirajo metabolizem, zato najprej vzpostavijo dihanje, nato pa še proces fotosinteze, potem pa korak za korakom obnovijo poškodovane celične komponente (preglednica 1) (Larcher, 2003).

Preglednica 1: Različni odzivi rastlin na sušno ter glavni mehanizmi, ki jih vključujejo (Larcher, 2003; Vilagrosa in sod., 2012).

Table 1: Different plant mechanisms and main plant responses to drought stress (Larcher, 2003; Vilagrosa et al, 2012).

Vrsta odziva	Način uravnavanja vodne bilance	Glavni mehanizmi, vključeni v odgovor rastline na stres
Izogib sušnemu stresu	Izohidra rastlina	Regulacija listnih rež Intenzivna rast korenin Povečan transport vode iz korenin v liste
Toleranca na sušni stres	Anizohidra rastlina	Zmanjšanje listne površine Spremembe v lastnostih celične stene Osmotska prilagoditev Povečano delovanje antioksidativnega sistema Koncentriranje topljencev (osmotska prilagoditev) Manjše možnosti za poškodovanje ksilema

Odgovor rastlin na sušni stres se odraža na več ravneh, in sicer na nivoju cele rastline, ter celičnem in molekularnem nivoju. Prilagoditve rastlin na sušni stres lahko delimo tudi na strukturne (morphološko-anatomske) in fiziološke (spremembe delovanja). Najpomembnejša učinka sušnega stresa sta motena rast in razvoj s spremembami v učinkovitosti izrabe vode. **Na ravni cele rastline** ima sušni stres velik vpliv na stanje vode v rastlini, saj se spremeni relativna vsebnost vode v rastlini ter transpiracija. Rast rastline je omejena zaradi razlik v celičnih delitvah, elongaciji in diferenciaciji celic, zaradi oslabljene encimske aktivnosti, izgube turgorja ter zmanjšanja oskrbe z energijo (Farooq in sod., 2012). **Na ravni organov in rastlinskih tkiv** ima sušni stres zelo velik učinek na fotosintezo in transpiracijo, ki sta zelo tesno povezana procesa, saj CO₂ in voda pri prehodu v/iz list/a prehajata po istih difuzijskih poteh. Eden zgodnejših odzivov rastlin na pomanjkanje vode je zapiranje listnih rež, ki omejuje izgubo vode s transpiracijo, hkrati pa lahko zmanjša razpoložljivost CO₂ in s tem fotosintezo (Farooq in sod., 2009), kar pa vpliva tudi na metabolno oslabitev. V sušnem stresu sta med prvimi prizadetimi procesi presnova ogljika in dušika zaradi spremenjenega fotosintetskega metabolizma ali povečanega oksidativnega stresa (Chaves in sod., 2002; Deeba in sod., 2012; Lawlor in Cornic, 2002). V rastlinah je vgradnja dušika zmanjšana zaradi omejene sinteze ATP in NADPH v svetlobnih reakcijah fotosinteze (ti dve molekuli podpirata redukcijo nitrata do amonija), poleg tega je zmanjšana tudi aktivnost nitrat reduktaze (Lawlor in Cornic, 2002). Učinek suše na fotosintezo je reguliran preko odzivnosti

respiratornega sistema, elektronskega transporta, sinteze ATP, akumulacije stresnih metabolitov, izražanja genov in sinteze proteinov (Aranjuelo in sod., 2011). Zmanjšanje fotosinteze se kaže kot zmanjšanje rasti listov, prezgodnje staranje listov, poleg tega je povezano z zmanjšanim pridelkom kmetijskih rastlin. Med pomembnejšimi vplivi suše na rastline je tudi slabša absorbčija anorganskih hranil zaradi motenj v njihovem privzemcu, njihovega metabolizma ter zmanjšanja ksilemskega toka (Farooq in sod., 2009; Farooq in sod., 2012). Vsi odgovori rastline na sušni stres pa so zelo povezani z vrsto in genotipom, vendar v splošnem tolerantne sorte venijo kasneje in so sposobne vzdrževati višji vodni potencial dlje kot občutljive sorte. **Na celičnem nivoju** se suša odraža v spremembi prostornine celice in obliku membrane, porušenju gradientov vodnih potencialov, izgubi turgorja (katere posledica je uvelost rastlin), izgubi celovitosti membrane, denaturaciji proteinov in koncentriranju topljencev. Rezultat popolne izgube proste vode je izsušitev oz. dehidracija (Bray, 1997). **Na molekularnem nivoju** pa se odgovor rastline na sušni stres pokaže kot spremembe v izražanju genov, ki povzročajo spremembe v proteinskem profilu in posledično spremembe v biološki funkciji proteinov (podoglavlje 2.3 Proteomske raziskave sušnega stresa pri rastlinah) ter sintezi metabolitov (Deeba in sod., 2012).

2.2.1 Vpliv suše na vodno bilanco rastline

Relativna vsebnost vode (RWC), vodni potencial lista (Ψ), osmotski potencial (Ψ_s), potencial tlaka (Ψ_p) in transpiracija (E) so glavni parametri povezane z vodno bilanco in se spremenijo v rastlinah, ki so izpostavljene sušnemu stresu (Farooq in sod., 2012). Seveda imajo rastline v sušnem stresu nižjo vrednost RWC kot tiste, ki so optimalno zalite. Rastlina lahko sprejema vodo skozi celotno površino, vendar je sprejem večine vode v rastlino neposredno povezan s koreninami, saj rastlina sprejema vodo iz tal samo dokler je vodni potencial korenin bolj negativen kot potencial tal (ali njihova neposredna okolica) (Larcher, 2003). Pretok vode s tal v korenine je močno odvisen od gradienca vodnega potenciala med tlemi in rastlino, hidravlične prevodnosti tal, tipa tal, vsebnosti vode v tleh ter vlažnosti v atmosferi (le-ta direktno povzroča izgube vode preko transpiracije) ter od tenzije v ksilemu. Glede na odgovor rastlin v sušnem stresu ločimo dva glavna tipa vodnih bilanc in sicer hidrostabilno (isohidro) in hidrolabilno (anisohidro) vodno bilanco (Preglednica 1). Hidrostabilne rastline so tiste, ki so sposobne vzdrževati ugodno vodno bilanco s hitrim odzivom stomatalnega aparata, ki je zelo odziven na pomanjkanje vode sicer pa je njihov koreninski sistem obsežen ter zelo učinkovit. K večji stabilnosti vodne bilance pripomorejo večje rezerve vode v skladiščnih organih in koreninah, s čimer si rastline zagotovijo večje prilaganje vodne bilance. Po drugi strani si hidrolabilne (anisohidre) rastline dovoljujejo večja nihanja v vodni bilanci, ter posledično povečanje osmotskega potenciala zaradi koncentriranja celičnega soka. Takšne rastline tolerirajo močna nihanja v vodnem potencialu ter začasno venjenje (Larcher, 2003; Domec in Johnson, 2012). V praksi strogega ločevanja med obema tipoma odgovora rastlin na sušni stres pogosto ni. Novejše raziskave kažejo, da

so lahko tudi pri anisohidrih rastlinah prisotni mehanizmi značilni za isohidre rastline, npr. zmanjšanje prevodnosti listnih rež ob zmanjšani razpoložljivosti vode in ob izpostavitvi suhemu zraku (Domec in Johnson, 2012). Razlike v odzivu vodnega stanja rastline na pomanjkanje vode se kažejo med rastlinskimi vrstami, pa tudi med sortami znotraj iste vrste (Domec in Johnson, 2012; Franks in sod., 2007; Gallé in sod., 2013; Schultz, 2003).

2.2.2 Zapiranje listnih rež

Listne reže so zelo pomembne pri aktivni regulaciji vodne bilance, saj je njihovo zapiranje/odpiranje eden osnovnejših odzivov rastline ob sušnem stresu. Prevodnost listnih rež (g_s) je parameter, ki meri stopnjo prehajanja CO_2 v rastlino ali vodne pare iz rastline skozi listne reže lista. Običajno se prevodnost listnih rež izraža v $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in prikazuje stopnjo izmenjave plinov preko celic zapiralk. Zapiranje listnih rež se tako uporablja tudi kot kazalec odziva rastline na sušo. Listne reže so sestavljene iz dveh celic zapiralk, ki regulirata zaprtost oziroma odprtost rež. Celice zapiralke zagotavljajo prehod CO_2 v list za fiksacijo ogljika v procesu fotosinteze, po drugi strani pa preprečujejo prekomerne izgube vode iz lista. S transpiracijo se poleg tega uravnava tudi temperatura lista (Reynolds-Henne in sod., 2010; Jones, 2014). V primeru, da je zmanjšana, se temperatura lista lahko poveča za nekaj stopinj (Lambers in sod., 2008). Delovanje listnih rež se uravnava z različnimi koncentracijami topljencev in količino vode v celici. Najprej se v blažjem sušnem stresu reže zapirajo hidropasivno, kar je rezultat evaporacije vode v atmosfero ter zmanjšanja potenciala tlaka v listni povrhnjici. Nato rastlina prične z zapiranjem rež hidroaktivno. Ta proces se prične, ko se sušni stres poveča. Ob zmanjšanju vodnega potenciala rastline iz celic zapiralk izhajajo osmotiki (K^+ ion), turgor zapiralk se zmanjša, zaradi česar se reža zapira (Taiz in Zeiger, 2006; Hopkins in Hüner, 2008). Iztok topljencev iz celic zapiralk aktivira abscizinska kislina (ABA), ki sodeluje pri regulaciji hidroaktivnega zapiranja listnih rež. ABA je regulativni hormon, ki uravnava rast rastlin ter zapiranje listnih rež. Ob neugodnih razmerah pomanjkanja vode se sinteza ABA poveča (tako v koreninah kot v listih). Ob povečanih koncentracijah ABA v listih se listne reže pričnejo zapirati. Nekaj ABA se iz kloroplasta sprosti v apoplast in takšna prerazporeditev ABA je odvisna od pH gradiента znotraj lista, od mobilnosti ABA in permeabilnosti membrane. Posledica takšne prerazporeditve ABA pa omogoča, da se s transpiracijskim tokom ABA prenese do celic zapiralk (Taiz in Zeiger, 2006). V primeru celic zapiralk so različni poskusi pokazali, da so lahko receptorji za zaznavanje ABA tako zunajcelični (na plazmalemi) kot znotrajcelični. Zunajcelični naj bi regulirali predvsem preprečevanje odpiranja listnih rež in ekspresijo genov, drugi pa inducirali odprtje listne reže. Prenos signala ABA v celici zapiralki poteka po več poteh, od katerih večina vključuje Ca^{2+} kot sekundarni sporočevalec. Pri tem lahko kot posredniki med kompleksom ABA-receptor in kanalčki delujejo reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species, ROS), inozitolfosfati, ciklična ADP-riboza, NO in druge signalne molekule. Povečana koncentracija Ca^{2+} v citosolu blokira K^+ kanalčke in zavira delovanje protonskih

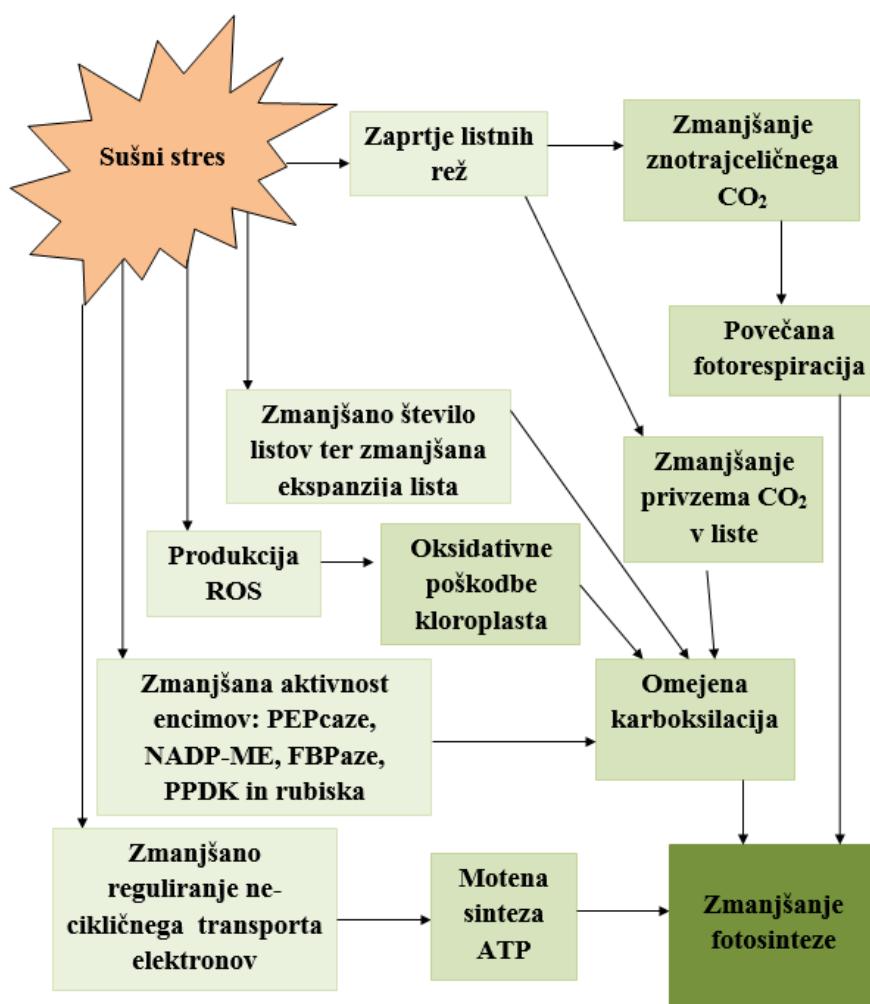
črpalk. Skupen rezultat teh procesov je depolarizacija celične membrane, izstop ionov in zapiranje listnih rež (Hladnik in Vodnik, 2007). ABA deluje tudi po poteh, ki niso neposredno povezane s povečanjem Ca^{2+} v citosolu, gre za signaliziranje, v katerem sodelujejo nekateri produkti presnove fosfolipidov in encimi fosfataze (Fan in sod., 2004). ABA ne vpliva samo na listne reže, ampak tudi na druge dogodke (spremeni namreč razmerje med korenino in nadzemnim delom), ki so del odgovora rastlin na pomanjkanje vode.

Skupna prevodnost listnih rež je odvisna od lastnosti rastline, kot so gostota listnih rež, starost in velikost lista, delovanje celic zapiralk, turgorja v epidermalnih celicahega ter signalov iz okolja (Jones, 2014; Chaves in sod., 2002). Najboljši kompromis med porabo vode in sprejemom CO_2 je takrat, ko so reže delno zaprte (Larcher, 2003). Kadar je rastlina v milejšem sušnem stresu, ima rahlo zmanjšanje stomatalne prevodnosti zelo zaščitni učinek pred stresom, saj daje rastlini možnost shranjevanja vode ter povečuje učinkovitosti izrabe vode (ang. water use efficiency, WUE). Majhno zmanjšanje prevodnosti rež namreč močneje omeji transpiracijo kot fotosintezo. WUE pa je parameter, ki kaže razmerje med procesoma fotosinteze in transpiracije. WUE je močno odvisen od vrste rastline, njene anatomije ter fiziologije lista. Povečanje WUE pomeni večjo fiksacijo CO_2 ob manjši porabi vode in v daljšem časovnem obdobju nakazuje na adaptacijo rastline na sušo. Zaradi omejene prevodnosti rež in zmanjšane koncentracije CO_2 v listu, rastlina ne more izkoristiti energije svetlobnega sevanja oz. je te lahko tudi preveč. Če je rastlina ne zmore odvesti, lahko odvečna energija povzroči poškodbe (Reddy in sod., 2004).

2.2.3 Omejeno delovanje fotosinteze

Fotosinteza je med primarnimi procesi, ki so prizadeti zaradi sušnega stresa. Omejeno delovanje fotosinteze v sušnem stresu se pojavi kot posledica zaprtja listnih rež (stomatalna inhibicija) ali zaradi metabolnih oslabitev (nestomatalna inhibicija). Zapiranje listnih rež vpliva na celoten fotosintetski metabolizem, zato se šteje za najbolj omejujoč dejavnik (Reddy in sod., 2004). Če primerjamo stomatalno in nestomatalno inhibicijo fotosinteze, je nestomatalna inhibicija fotosinteze veliko bolj kompleksna in se pojavlja v večjem obsegu (Farooq in sod., 2009). Rubisko (ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza) je encim, ki se nahaja v stromi kloroplasta in sodeluje pri ogljikov reakcijah fotosinteze. V več raziskavah so ugotovili, da se ob pomanjkanju vode zmanjša koncentracija in aktivnost encima rubiska (Aranjuelo in sod., 2011; Deeba in sod., 2012; Durand in sod., 2011; Zadražnik in sod., 2013), kar posledično zmanjšuje delovanje fotosinteze. Sušni stres povzroča zakisanost strome kloroplasta, kar povzroči inhibicijo aktivnosti rubiska (Reddy in sod. 2004). Eden izmed inhibitorjev rubiska je CA1P (2-carboxy-d-arabinitol 1-phosphate), saj so našli povečanje koncentracije CA1P ob povečevanju suše, posledično pa tudi

zmanjšanje aktivnosti rubiska. Zaviranje procesa fotosinteze pa lahko po drugi strani povzroči tudi zmanjšanje regeneracije rubiska (Reddy in sod., 2004; Osakabe in sod., 2014). Sušni stres vpliva tako na fotosintezo kot na zmanjšano porabo asimilatov v rastučih listih. Floemski transport je odvisen od turgorja ter vodnega potenciala, ki sta ob pomanjkanju vode znatno zmanjšana, posledično je inhibirana tudi translokacija asimilatov (Taiz in Zeiger, 2006). Slika 1 prikazuje mehanizme, ki ob suši prispevajo k zmanjšanju fotosinteze. Sušni stres med drugim poruši ravnovesje med procesoma produkcije reaktivnih kisikovih spojin (ROS) ter antioksidativnega obrambnega mehanizma pred njihovo akumulacijo v celicah. Zapiranje listnih rež povzroči zmanjšan dotok CO₂, kar posledično zmanjša koncentracijo CO₂ v listu. Zaradi manjše razpoložljivosti CO₂ je zmanjšana karboksilacija, zato se preostali prosti elektroni porabljajo pri tvorbi ROS in v procesu fotorespiracije, ki je stimulirana tudi zaradi neugodnega razmerja med koncentracijo O₂ in CO₂ v listu.



Slika 1: Mehanizmi odziva rastline na sušo, ki povzročajo zmanjšano aktivnost fotosinteze (Farooq in sod., 2012).
Figure 1: Drought-induced plant mechanisms, contributing to the decrease of photosynthetic activity (Farooq et al., 2012)

Vsi ti procesi potekajo zaradi zmanjšane aktivnosti encimov: rubiska, fosfoenolpiruvat karboksilaze (PEPcaza), NADP- malatnega encima (NADP-ME), fruktoze-1,6-bisfosfataze (FBPaza) ter piruvat ortofosfataze (PPDK). Zmanjšanje NADPH povzroči zmanjšan neciklični (linearni) transport ob katerem se hkrati zmanjša tudi sinteza ATP (slika 1) (Farooq in sod., 2012).

Nestomatalna inhibicija fotosinteze je lahko povezana z zmanjšano fotokemično učinkovitostjo. Učinkovitost svetlobnih reakcij fotosinteze lahko vrednotimo z meritvami fluorescence. V ugodnih rastnih razmerah fluorescenza predstavlja manjši delež eksitacijske energije (do 5 %), medtem ko se fluorescenza v stresnih razmerah močno poveča, saj se energija ne porablja več za fotosintezo. Abid in sod. (2016) navajajo, da se je v splošnem fotokemična učinkovitost pokazala kot eden izmed parametrov tolerance rastline na sušni stres. Pri čičeriki, kitajskem fižolu ter bobu, je omenjeni paramter veliko višji v tolerantnih sortah v primerjavi z občutljivimi, kadar so izpostavljene suši.

2.2.4 Osmotska prilagoditev rastlin

Osmotska prilagoditev rastlin ali osmoregulacija je proces akumuliranja organskih ter anorganskih topljencev v sušnih pogojih, ki pomagajo vzdrževati nižji vodni potencial brez zmanjšanja dejanske vsebnosti vode. Prisotnost topljencev ne pomaga le vzdrževati turgorskega tlaka, ampak tudi varuje encime ter makromolekule v celicah pred potencialnimi poškodbami ROS (Farooq in sod., 2012). Osmotska prilagoditev pomaga tudi pri vzdrževanju večje stomatalne prevodnosti in posledično učinkovitejše privzemanje CO₂ ter izboljšan privzem hranil iz korenin (Farooq in sod., 2012). Omenjeni topljenci (osmotiki) imajo nizko molekulsko maso, so zelo topni in niso toksični tudi v visokih koncentracijah. V splošnem imajo osmotiki funkcijo zaščite rastlin pred stresom. Med njimi najbolj znani in raziskani so sladkorji (saharoza, maltoza, itd.), sladkorni alkoholi, aminokislini prolin in glicin, glicinbetain, organske kisline, kalcij, kalij, kloridni ioni, itd. Ob zmanjšani razpoložljivosti vode se ti topljenci kopijo, osmotski potencial celic se posledično zmanjša, kar pa privlači vodo v celice ter na ta način pomaga vzdrževati turgor (Farooq in sod., 2009; Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Tvorba osmotikov je ena najboljših možnosti za stabilizacijo membrane in vzdrževanje strukture pri nizkem vodnem potencialu (Reddy in sod., 2004).

2.2.5 Oksidativni stres

Izpostavljanje rastlin kateremu koli abiotikemu stresu povzroča nastanek ROS, ki lahko povzročajo oksidativni stres. V splošnem je nastanek ROS rezultat odvečne energije v fotosistemu II kot posledica zmanjšanja delovanja fotosinteze. Le - te na biokemijskem

nivoju povzročijo oksidativne poškodbe ogljikovih hidratov in lipidov ter razgradnjo proteinov in klorofilov. Tvorba ROS (superoksidni ion $\cdot\text{O}_2^-$, vodikov peroksid H_2O_2 in hidroksilni radikal $\cdot\text{OH}$) je razlog za nastanek oksidativnega stresa, saj se na membranah in celičnih stenah kopičijo strupeni produkti reakcij ROS. Posledično ROS povzročajo poškodbe membran, oksidacijo aminokislin (ki ima za posledico denaturacijo proteinov), oksidacijo sladkorjev ter organskih baz nukleinskih kislin, inaktivacijo encimov ter povečanje možnosti za proteolitsko razgradnjo proteinov (Šircelj, 2001). Proti negativnim učinkom ROS se rastline branijo endogenimi antioksidativnimi obrambnimi sistemi (encimski, ne-encimski sistemi) (Aranjuelo in sod., 2011; Larcher, 2003; Reddy in sod., 2004). Med ne-encimske antioksidativne sisteme spadajo askorbinska kislina, pigmenti iz skupine karotenoidov, glutation. Askorbinska kislina je pomemben antioksidant, ker ne reagira le z H_2O_2 , ampak tudi z ionom $\cdot\text{O}_2^-$, OH^- in lipidnimi peroksidazami. Poleg tega je askorbinska kislina vpletena tudi v druge aktivnosti v rastlini za obrambo pred oksidativnim stresom: kot antioksidant v elektronskem transportu v plazemski membrani ali v kloroplastu (Reddy in sod., 2004). Kot mehanizem odstranjevanja ROS ima poleg askorbinske kisline pomembno vlogo tudi glutation, s katerim se povezujeta v askorbatno-glutationsko verigo. Glutation je v rastlini večinoma v reducirani obliki (GSH), v stresnih razmerah pa se pretvori v oksidirano obliko (GSSG-glutation disulfid). Po koncu stresnih razmer se GSSG pretvori nazaj v GSH s pomočjo glutation reduktaze. Askorbat reducira ROS, se pri tem oksidira in se v celici preko glutationa ponovno reducira. Poleg omenjenih spojin imajo antioksidativno delovanje v rastlinah še flavonoidi, polifenoli, vitamini, karotenoidi, tokoferoli, itd.. V encimskih antioksidativnih sistemih pa so najpomembnejši encimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), peroksidaza (POD), glutation reduktaza (GR) in monodehidroaskrobat reduktaza (MDAR) (Foyer in Noctor, 2011).

2.3 PROTEOMSKE RAZISKAVE SUŠNEGA STRESA PRI RASTLINAH

Sinteza proteinov je eden izmed odgovorov rastlin na pomanjkanje vode. Večina takšnih proteinov je topnih v vodi in prispevajo k večji toleranci rastlin s hidratacijo celičnih struktur (Farooq in sod., 2009). Proteomika nam daje možnost, da najdemo odgovorne proteine pri sodelovanju odziva rastlin na sušni stres. Proteomske študije so orodje za boljše razumevanje kompleksnih mehanizmov, ki se vzpostavijo v rastlini, izpostavljeni sušnemu stresu. Tudi z drugimi molekularnimi in genetskimi študijami pri različnih rastlinah so odkrili številne gene, ki se aktivirajo v sušnem stresu (vključno s prepisovalnimi dejavniki, ki regulirajo izraženje genov). Ti identificirani geni so vključeni v toleranco na sušni stres in so eno glavnih orodij za genski inženiring v smeri izboljšanja tolerance na sušni stres (Mohammadi in sod., 2012, Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Proteomika je področje, kamor spada analiza proteinov, interakcije proteinov ter modifikacije proteinov v organizmu. Proteini so nosilci večine bioloških funkcij in zato je za lažje razumevanje delovanja celic potrebno identificirati prisotne proteine, ugotoviti kje

se nahajajo, kako se ti proteini povezujejo v interakcije z drugimi molekulami ter kakšne so njihove funkcije tekom razvoja in/ali v bolezenskih stanjih (Križaj, 2008; Fonovič, 2008). V okviru proteomskega raziskava sistematično identificiramo proteine, ki se pojavijo v celici ali tkivu v določenem trenutku, določamo pa lahko tudi najpomembnejše lastnosti posameznih proteinov (kot npr. vsebnost proteinov, njihove modifikacije, sodelovanje v multiproteinskih kompleksih) (Issaq, 2001). Potrebno je pogledati preko genomske ravni, saj podatki o nukleotidnem zaporedju ne zagotavljajo popolne slike organizma. Nivo genomske ali transkriptomskih raziskav nam ne daje popolne informacije o celični regulaciji (ne moremo videti post-translacijskih sprememb kot je glikozilacija, fosforilacija, proteolitsko procesiranje), kajti en gen kodira več kot en protein, dinamika izražanja proteinov pa se spreminja glede na intra - ali ekstra - celularni stres. Zaznavanje sprememb v organizmih po translaciji je ena izmed večjih prednosti proteomskega metodološkega pristopa. Spremljanje sprememb v celici na nivoju proteinov pa omogoča dovolj informacij za podrobnejše razumevanje fiziološkega stanja rastline (Dhingra in sod., 2005).

Proteomske študije sušnega stresa so usmerjene predvsem k raziskavam kmetijskih rastlin, kjer so že odkriti kompleksi mehanizmi odgovora na sušni stres, z opredelitvijo izražanja proteinov (Mohammadi in sod., 2012; Rodziewiez in sod., 2014). Proteomske analize rastlin izpostavljenih sušnemu stresu so že bile opravljene pri čičeriki (*Cicer arietinum*) (Pandey in sod., 2007), soji (*Glycine max*) (Alam in sod., 2010), grahu (*Pisum sativum*) (Taylor in sod., 2005), navadnem fižolu (*Phaseolus vulgaris*) (Zadražnik in sod., 2013), pšenici (*Triticum aestivum*) (Zhang in sod., 2014; Faghani in sod., 2015), lucerni (*Medicago sativa*) (Aranjuelo in sod., 2011), rižu (*Oryza sativa*) (Muthurajan in sod. 2010; Bazargani in sod., 2011), bombažu (*Gossypium herbaceum*) (Deeba in sod., 2012) in maniok (*Manihot esculenta*) (Zhao in sod., 2015). Prav tako so že objavljene proteomske študije sušnega stresa pri drevesnih vrstah kot so kavčukovec (*Hevea brasiliensis*) (Wang, 2014), jablana (*Malus domestica*) (Zhou in sod., 2015), medvrstni križanec *Populus tremula* x *P. alba* (Durand in sod., 2011), dob (*Quercus robur*) (Sergeant in sod., 2011) (Preglednica 2). Pandey in sod. (2007) so raziskali proteine čičerike, izpostavljenе sušnemu stresu ter ugotovili, da so diferencialno izraženi proteini vključeni v procese transkripcije, podvojevanje DNK, celično signalizacijo, preoblikovanje kromatina ter v delovanje šaperonov. Identificirani proteini so tako regulatorni kot funkcionalni. S proteomsko analizo so Alam in sod. (2010) ugotovljali proteine povezane s sušnim stresom v koreninah soje. Ugotovili so, da so ti proteini predvsem vključeni v ogljikov in dušikov metabolizem, procese v celični steni, signalno transdukcijo, obrambo celice in programirano celično smrt. Diferencialna proteomska raziskava navadnega fižola je pokazala, da so proteini povezani s sušnim stresom vključeni v energijski metabolizem, fotosintezo, sintezo proteinov, proteolizo ter obrambni mehanizem rastline (Zadražnik in sod., 2013). Pri analizi proteinov pšeničnega semena, izpostavljenega sušnemu stresu, so Zhang in sod. (2014) identificirali proteine, vključene v energijski metabolizem, signalno transdukcijo, našli pa so nekaj proteinov, ki sodelujejo v obrambi pred stresom. Novejša raziskava na dveh, na sušo različno odpornih sortah pšenice

(Faghani in sod., 2015) je pokazala, da se pri obeh sortah ob izpostavljenosti sušnemu stresu izrazijo proteini vključeni v obrambne procese, sintezo proteinov, energijski metabolizem, sintezo ATP, fotosintezo, signalne procese in transdukcijo. Kot pomembne izpostavlja diferencialno izražene proteine kot so endo-1,3-beta-glikozidaza, peroksidaza, S-adenozilmetionin sintazo, malat dehidrogenazo, ki so bili bolj izraženi v koreninah ali listih bolj tolerantne sorte. Pri lucerni v sušnem stresu so identificirane diferencialno izražene proteine uvrstili v procese energijskega metabolizma, sinteze proteinov, transporta in obrambe pred stresom (Aranjuelo in sod., 2011). Odziv riža v sušnem stresu se je na proteinskem nivoju odražal z diferencialnimi proteini, vključenimi v antagonistično delovanje abscizinske kisline (ABA) in gibberelinske kisline (GA). Omenjeno antagonistično delovanje, kjer se koncentracija ABA poveča ter GA zmanjša, predpostavlja kot ključno pri razumevanju neuspešne tvorbe latov pri rižu v suši ter posledično povečanje sterilnosti klaskov (Muthurajan in sod., 2010). Pri bombaževcu v sušnem stresu so bili identificirani proteini vključeni predvsem v signalno transdukcijo ter delovanje antioksidantov (Deeba in sod., 2012). Pri jablani so bili določeni proteini povezani s sušnim stresom vključeni v procese Kalvinovega cikla, fotosinteze, svetlobnega dihanja ter uravnavanja redoks potenciala (Zhou in sod., 2015). Kot trajnica je bil v proteomsko raziskavo sušnega stresa vključen tudi topol, kjer so ugotovili, da se pri odzivu na stres pomembno vključujejo procesi fotosinteze, energijskega metabolizma, metabolizma dušika in proteinov, spremembe v zvijanju proteinov, oksidoreduktijske reakcije ter drugi procesi (Durand in sod., 2011). Rezultati študije sušnega stresa pri manioku, ki je ena izmed bolj tolerantnih rastlin na sušni stres kažejo predvsem diferencialno izražene proteine, vključene v procese odstranjevanja ROS ter v sekundarni metabolizem (Zhao in sod., 2015).

LEA (angl. late embryogenesis abundant) proteini so med pomembnejšimi proteini, katerih koncentracija se poveča v rastlinah, izpostavljenih sušnemu stresu. LEA proteini delujejo kot šaperoni, ki stabilizirajo vezikle, proteine in membranske strukture v rastlinah. Poleg tega je njihova prisotnost povezana tudi s povečano koncentracijo ABA in z zaostankom v rasti rastline. V rižu so Muthurajan in sod. (2010) našli 4 različne LEA proteine sintetizirane *de novo* po izpostavljenosti sušnemu stresu. Dehidrini spadajo med LEA proteine, katerih glavna funkcija je zmanjševanje negativnih učinkov ROS na celične procese v rastlini (Alam in sod., 2010). Dehidrini delujejo preko več mehanizmov, in sicer zaščitijo encime v sušnih pogojih odstranjujejo škodljive molekule ali delujejo kot membranski stabilizatorji (Pandey in sod., 2007). Protein dehidrin so našli v koreninah soje, kot *de novo* sintetiziran protein po izpostavitvi rastline sušnemu stresu (Alam in sod., 2010). Povečana vsebnost dehidrinov je prisotna tudi pri odgovoru na sušni stres čičerike in navadnega fižola (Pandey in sod., 2007; Zadražnik in sod., 2013).

Preglednica 2: Pregled nekaterih proteomskih raziskav sušnega stresa.

Table 2: Overview of main proteomic studies of drought stress.

Rastlina	Tkivo/ celični organel	Trajanje sušnega stresa	Metoda	Glavne ugotovitve	Referenca
Čičerika (<i>Cicer arietinum L.</i>)	Celično jedro	24 – 144 h	2D-PAGE LC-MS-MS	205 diferencialno izraženih proteinov, od teh je bilo 147 identificiranih v povezavi s sušnim stresom.	Pandey in sod., 2007
Soja (<i>Glycine max</i>)	Korenine	7 dni	2D-PAGE MALDI-TOF	45 diferencialno izraženih proteinov, od teh 28 identificiranih in povezanih s sušnimi stresom.	Alam in sod., 2010
Navadni fižol (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)	Listi	7-17 dni	2D-DIGE LC-MS-MS	58 diferencialno izraženih in identificiranih proteinov v sorti Tiber in 64 v sorti Starozagorski	Zadražnik in sod., 2013
Pšenica (<i>Triticum aestivum</i>)	Listi, korenine	20 % poljske kapacitete SWC	2D-PAGE nanoLC-MS-MS	113 proteinov je bilo identificiranih v koreninah in 49 v listih ter povezanih s sušnim stresom.	Faghani in sod., 2015
Lucerna (<i>Medicago sativa</i>)	listi	7 dni	2D-PAGE ESI-LC MS-MS	26 proteinov so identificirali in povezali s sušnim stresom.	Aranjuelo in sod., 2011
Riž (<i>Oryza sativa</i>)	Listni pecelj	3 dni	2D-PAGE MALDI-TOF	31 diferencialno izraženih proteinov in identificiranih ter povezanih s sušnim stresom.	Muthurajan in sod., 2010
Bombaževec (<i>Gossypium herbaceum L.</i>)	Listi	35-75 % RWC	2D-PAGE MALDI TOF/TOF	16 identificiranih proteinov bolj izraženih v tretiranih rastlinah na sušni stres in 6 manj izraženih.	Deeba in sod., 2012
Jablanica (<i>Malus domestica</i>)	Listi	45-55 % poljske kapacitete SWC	2D-PAGE nanoLC-MS-MS	78 proteinov je bilo identificiranih in povezani z odzivom rastline na sušni stres.	Zhou in sod., 2015
Medvrstni križanec <i>Populus tremula L x P. alba L.</i>	listi	12 dni	2D-PAGE MALDI-TOF-TOF	91 diferencialno izraženih proteinov v listih in 65 v kambiju. Identificiranih in s sušo povezanih proteinov je bilo v listih 52 proteinov in 36 v kambiju.	Durand in sod., 2011
Dob (<i>Quercus robur L.</i>)	Listi	Do 15 % relativne vsebnosti vode (RWC) v listih	2D-DIGE MALDI TOF/TOF	113 diferencialno izraženih proteinov, od teh 95 identificiranih ter povezanih s sušnim stresom.	Sergeant in sod., 2011
Maniok (<i>Manihot esculenta</i>)	Listi in korenine	Do takšne stopnje, da so se rastline še lahko regenerirale	LC-ESI-MS/MS	154 proteinov je bilo diferencialno izraženih, identificiranih ter povezanih s sušnim stresom.	Zhao in sod., 2015

Proteini topotnega šoka (ang. heat shock proteins, HSP) spadajo v skupino molekularnih šaperonov, ki preprečujejo denaturacijo drugih proteinov. Največkrat so HSP proteini s proteomskim pristopom določeni pri odzivu rastlin na stres zaradi visokih temperatur, vendar je takšen stres v naravnih pogojih večkrat povezan tudi s sušnim stresom (Kosová in sod., 2011). V raziskavi sušnega stresa pri čičeriki so našli sHSP (small heat shock pretein) s povečanim odzivom v sušnem stresu. Ti proteini se vežejo na odvite proteine (Pandey in sod., 2007). Prav tako so pri jablani našli več različnih oblik HSP s povečanim izražanjem, kar pripisujejo vključenosti HSP tudi v regulacijo zapiranja listnih rež kot odgovor na povečanje ABA v rastlini s povečano učinkovitostjo izrabe vode (ang. water use efficiency, WUE) (Zhou in sod., 2015). V koreninah soje so našli Hsp70 protein, vendar je v nasprotju s prejšnjima raziskavama (Pandey in sod., 2007; Zhou in sod., 2015) vsebnost istega proteina v rastlinah s pomanjkanjem vode manjša v primerjavi z optimalno zalitimi rastlinami. Predvidevajo, da je razlog v zmanjšanju produkcije HSP in s tem povečanjem tvorbe ROS (Alam in sod., 2010). Tako pri soji kot tudi pri dobu v suši so našli povečanamp vsebnost HSP (Sergeant in sod., 2011). V rižu so Muthurajan in sod. (2010) našli v rastlinah, izpostavljenih sušnemu stresu HSP protein tvorjen *de novo*.

V stresnih razmerah se v rastlinah pričnejo kopici ROS kot je opisano v poglavju 2.2.5. ROS so v sušnem stresu delujejo kot signalne molekule, vendar ko je njihova koncentracija v celici previsoka, povzročajo škodo na proteinih, DNA in lipidih. Posledično imajo rastline mehanizme za zmanjšanje koncentracije ROS v celicah (Pandey in sod., 2007; Zadražnik in sod., 2013). SOD (super-oksid dismutaza) je eden glavnih antioksidativnih encimov, ki $\cdot\text{O}_2^-$ pretvarja v H_2O_2 . Našli so ga v čičeriki, pšenici, lucerni kot bolj izraženega v sušnem stresu v primerjavi z optimalno zalitimi rastlinami (Pandey in sod., 2007; Faghani in sod., 2015; Aranjuelo in sod., 2011). Pri manioku so raziskali aktivnost encima SOD ter ugotovili, da se njegova aktivnost v sušnem stresu izrazito poveča, prav tako kot tudi aktivnost peroksidaz (POD) (Wang, 2014). POD so encimi, ki se nahajajo v apoplastu celice in so vključeni v lignifikacijo, suberizacijo celične stene ter delujejo v obrambi pred patogeni. Povečano tvorbo POD ob izpostavljenosti sušnemu stresu so potrdili pri pšenici, topolu, manioku, čičeriki (Durand in sod., 2011; Faghani in sod., 2015; Pandey in sod., 2007; Zhao in sod., 2015).

V splošnem so bili diferencialno izraženi ter identificirani proteini vključeni v različne poti, predvsem v energijski metabolizem, sekundarni metabolizem, fotosintezi, sintezi ATP, sintezi proteinov, proteolizo, transport, strese odgovore v rastlini. Pregledni članek Mohammadi in sod. (2012) povzema, da se pri procesih kot je: glikoliza (kjer je predvsem povečana vsebnost fosfofruktokinaze, fosfoglicerat mutaze, enolaze, medtem ko je zmanjšana vsebnost gliceraldehyd-3P-dehidrogenaze, aldolaze, trifosfata, piruvat dehidrogenaze), cikel trikarboksilnih kislin (kjer je povečana vsebnost akonitaze, glutamin sintaze, malat dehidrogenaze ter zmanjšana vsebnost aktinitaze izocitrat dehidrogenaze,

citrat sintaze, metionin sintaze) ter sinteza ATP (s povečano vsebnostjo ATP sintaze) največkrat pokaže vključenost omenjenih procesov v odziv rastlin na sušni stres.

2.4 SUŠNI STRES PRI HMELJU

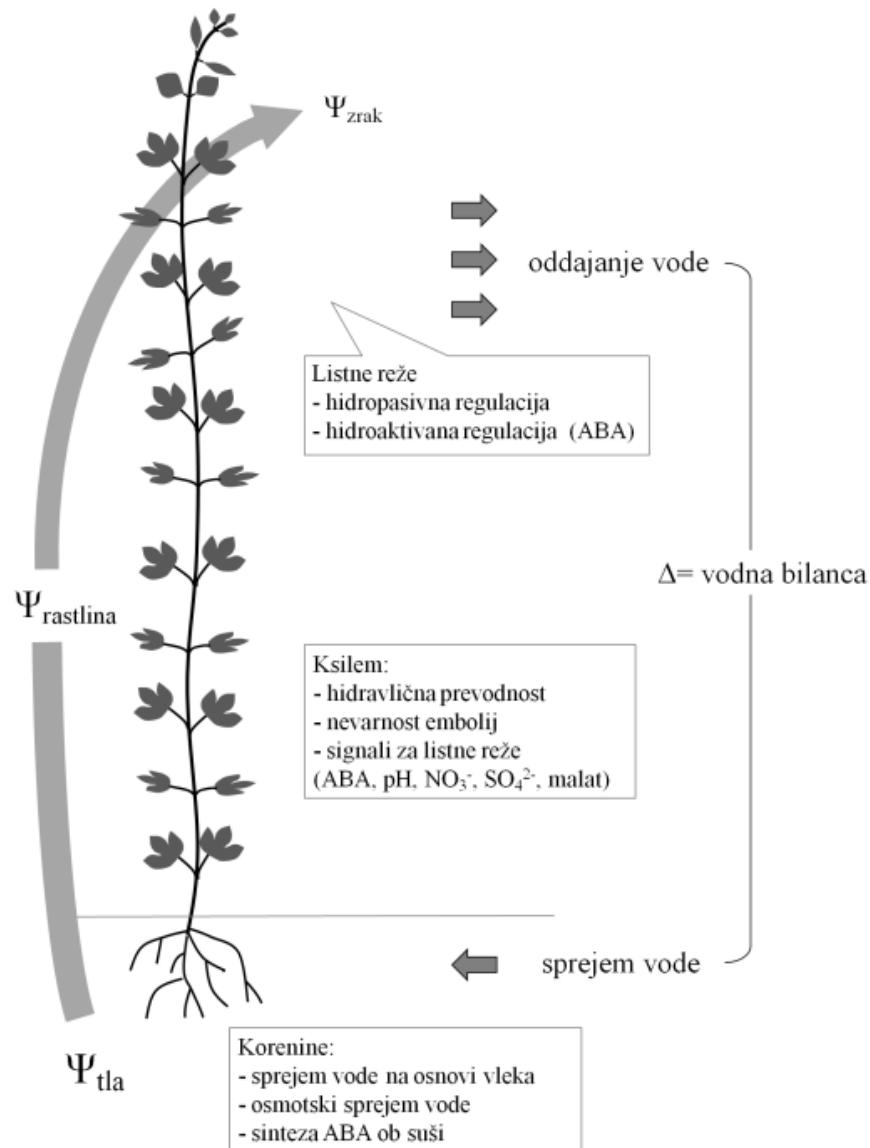
Sušni stres je pri hmelju relativno slabo raziskan. V zadnjih letih so znane objave strukturnih sprememb hmelja v sušnem stresu (Gloser in sod., 2011, 2013; Jupa in sod., 2013, 2016) in nekaj raziskav o spremenjenem metabolizmu in fiziološkem stanju hmelja zaradi pomanjkanja vode (Čeh in sod., 2007; Čeh in sod., 2009; Čerenak in sod., 2010; Korovetska in sod., 2014, 2015).

Hmelj za svojo rast potrebuje velike količine vode zaradi relativno velike listne površine. Liste z vodo oskrbuje steblo, ki je lahko dolgo tudi do 12 m in je zelo ozko (do 10 mm) kar je značilno za lijane. Večino vode dobijo preko ksilema, ki je sestavljen iz daljših trahej (do 1,2 m) s premerom do 300 µm in tako zagotavljajo večjo hidravlično prevodnost (Jupa in sod., 2013; Jupa in sod., 2016). Veliko razmerje med listno površino ter prevodno površino stebla, skupaj s hidravlično prevodnostjo, prispeva k hitrejšemu ksilemskemu toku ter normalni oskrbi z vodo v višjih delih rastline (Andrade in sod., 2005). Vendar lahko že manjša suša povzroči anatomske spremembe v strukturi ali delovanju ksilema, saj lahko že manjše poškodbe trahej povzročijo znatno zmanjšanje preskrbe z vodo v zgornjem delu rastline hmelja (Jupa in sod., 2016). Po drugi strani pa širše traheje ksilema pomenijo večja tveganja za embolije. To je posebej problematično pri vzpenjalkah, saj v sušnem stresu potrebujejo uspešne hidravlične lastnosti, da je zagotovljena zadostna količina vode v vse dele rastline (Kolenc in sod., 2014). Gloser in sod. (2011) navajajo, da je premer trahej primarnega ksilema 40 do 82 µm, v dolžino pa merijo do 30 cm. Premer trahej sekundarnega ksilema pri hmelju meri povprečno 73 µm (lahko pa dosežejo velikost tudi do 209 µm), v dolžino pa do 75 cm. Zaradi širših in daljših trahej je sekundarni ksilem učinkovitejši za prevajanje topljencev. Študija na treh čeških sortah (Agnus, Osvaldov klon 31, Vital) je pokazala, da med njimi ni večjih razlik v hidravličnih lastnostih ksilema (povprečno $1,68 \times 10^{-6} \text{ m}^4/\text{MPa/s}$). Glede na to sklepajo, da so v sušnih razmerah te sorte podobno izpostavljene težavam, ki nastanejo zaradi prekinitev transporta vode, kar je posledica nastalih embolij (Jupa in sod., 2013). Jupa in sod. (2016) so raziskali tudi specifično prevodnost listov (ang. leaf specific conductivity, LSC), ki je razmerje med hidravlično prevodnostjo in listno površino. V sušnih razmerah se LSC zelo zmanjša. Ugotovljeno je tudi, da se število nodijev pri hmelju, izpostavljenemu sušnemu stresu, ne spremeni, vendar pa predvidevajo, da nodiji v zgornjih delih rastline pomagajo pri vzdrževanju neprekinjenega vodnega transporta pri tistih trahejah, ki so prizadete zaradi nastalih embolij. Poleg tega so ugotovili, da so lahko ob sušnem stresu traheje v ksilemskih žilah na določenih odsekih ožje. To je ena od strukturnih prilagoditev na sušni stres, ki po drugi strani onemogoča normalen transport vode po žilah. Pri hmelju so našli povprečno 75 % razliko med najožjimi in najširšimi trahejami (Jupa in sod., 2016). V bazalnem delu rastline so ob pomanjkanju vode

ožje traheje in poveča se tvorba til. Po drugi strani se v apikalnem delu pojavlja povečana tvorba novih žil z večjo radialno prevodnostjo. Ugotovljene strukturne ter anatomske lastnosti hmelja, ki omejujejo transport vode med pomanjkanjem vode, se odražajo na zmanjšanem vodnem potencialu listov hmelja. Zaradi velikih hodov vodnega potenciala v dnevnem ciklu so hmelj označili kot anisohidro rastlino (Gloser in sod., 2013). Kasneje je bil raziskan tudi odziv hmelja na nivoju listnih rež, saj se ob sušenju tal zmanjša transpiracija, kar kaže na povezanost s procesi, ki regulirajo odzivnost listnih rež (Gloser in sod., 2013). Na listnih odziv rež pri hmelju imajo velik vpliv hidravlični ter kemični signali iz korenin ob zaznanem pomanjkanju vode. Med hidravlične signale prištevamo spremembe vodnega potenciala, med kemične pa abscizinsko kislino (ABA), spremembe pH ksilemske tekočine (ki se ob sušnem stresu poveča), spremembe v koncentraciji ionov mineralnih hranil (sulfat, nitrat), organskih kislin (malat, citrat), proteinov ter sladkorjev v ksilemski tekočini. Ugotovljeno je bilo, da se pri hmelju ob sušnem stresu transpiracija zmanjša skladno s povečevanjem pH ksilemske tekočine, kar je posledica zmanjšanja nitrata in fosfata (zaradi neravnovesja med anioni ter kationi). K povečanju pH ksilema pa prav tako vpliva tudi koncentracija malata, medtem ko povečana koncentracija sulfata kaže vpliv na delovanje ABA. Istočasno se namreč poveča tudi koncentracija ABA v listih, kar prispeva k zapiranju listnih rež ter zmanjšanju transpiracije (slika 2) (Korovetska in sod., 2014; Kolenc in sod., 2014). Ugotovili so, da je splošen ionski učinek odvisen od hidravlične prevodnosti oziroma hidravlične upornosti in zato se le - ta kaže pri hmelju kot nadomestni mehanizem za prenos vode v zgornje dele rastline (Jupa in sod., 2016).

Odkrili so tudi delovanje ABA v odzivu hmelja na pomanjkanje vode v tleh. Vsi metaboliti, vključeni v delovanje ABA v listih ter ksilemskem soku (razen ABA glukozil estra v listih) so bili povečani ob sušnem stresu in med prevladujočimi sta bila fazeična kislina (ang. phaseic acid) ter dihidrofazeična kislina. Po drugi strani se je koncentracija ABA glukozil estra zmanjšala v primerjavi s povečano koncentracijo ABA. Zmanjšala pa se je tudi koncentracija jasmonatov, medtem ko povečane koncentracije hormona avksina nakazujejo njegovo vključenost v odgovor hmelja na sušni stres (Korovetska in sod., 2015).

V sušnem stresu so v trti in storžkih rastline hmelja našli povečano vsebnost kalija ter zmanjšano vsebnost magnezija in kalcija (Majer, 2000b, 1997). S poljskim in lončnim poskusom pri sorti Savinjski golding je Majerjeva (2000a) ugotovila, da sušni stres pri hmelju značilno vpliva na stomatalno prevodnost, neto fotosintezo, vsebnost nitratov v listih in trti, na vsebnost kalija, kalcija, magnezija in fosforja v trtah, storžkih, na težo zelene mase, storžkov, korenin, na sestavo eteričnega olja, nadzemni habitus rastlin, na vsebnost prolina v listih ter na delež okužbe s hifami mikoriznih gliv. Meritve so pokazale, da razlike v vsebnosti vode v listih glede na različna obravnavanja niso statistično značilne, po drugi strani pa je sušni stres zmanjšal prevodnost listnih rež šele, ko se je stopnja preskrbljenosti tal z vodo zmanjšala za 50 % poljske kapacitete. Posledično sta se zaradi zapiranja listnih rež zmanjšali transpiracija in fotosinteza (Majer, 1997, 2000a).



Slika 2: Vodna bilanca hmelja ter njeno uravnavanje (Kolenc in sod., 2014).
Figure 2: Water balance in hop and its regulation (Kolenc et al., 2014).

S poljskim in lončnim poskusom pri sorti Savinjski golding je Majerjeva (2000a) ugotovila, da sušni stres pri hmelju značilno vpliva na stomatalno prevodnost, neto fotosintezo, vsebnost nitratov v listih in trti, na vsebnost kalija, kalcija, magnezija in fosforja v trtah, storžkih, na težo zelene mase, storžkov, korenin, na sestavo eteričnega olja, nadzemni habitus rastlin, na vsebnost prolina v listih ter na delež okužbe s hifami mikoriznih gliv. Meritve so pokazale, da razlike v vsebnosti vode v listih glede na različna obravnavanja niso statistično značilne, po drugi strani pa je sušni stres zmanjšal prevodnost listnih rež šele, ko se je stopnja preskrbljenosti tal z vodo zmanjšala za 50 % poljske kapacitete. Posledično sta

se zaradi zapiranja listnih rež zmanjšali transpiracija in fotosinteza (Majer, 1997, 2000a). Raziskave slovenskih sort hmelja v sušnem stresu so pokazale tudi, da se med pomanjkanjem vode poveča koncentracija ksantohumola v listih, medtem ko se koncentracija polifenolov zmanjša (Čeh in sod., 2007). Prav tako je bilo ugotovljeno, da je v listih hmelja povečana vsebnost kalija in proolina v sušnih razmerah, zaradi česar sta bila kalij (kot osmolit) ter prolin (hormon) označena tudi kot potencialna biokemijska markerja (Čeh in sod., 2009). Opravili so tudi nekaj dodatnih fizioloških meritev sušnega stresa pri hmelju (Čerenak in sod., 2010). Čerenak in sod., 2010 so ugotovili nihanja v relativni vsebnosti vode (ang. relative water content, RWC) v listih pri hmelju. V listih kontrolnih rastlin hmelja je bila RWC vrednost okrog 90 %, razlika je bila očitna pri sušnih rastlinah, kjer je glede na čas trajanja suše RWC enakomerno padal pri obeh vključenih sortah (Aurora (AU) in Savinjski golding (SG)) enako. Razliko med sortama so našli pri kasnejši regeneraciji rastlin, kjer se je sorti AU (pri sušnem obravnavanju) v krajišem časovnem obdobju izrazito povečal RWC glede na sorto SG. Med poskusom so opazili tudi močan vpliv suše na fotokemično učinkovitost (parameter Fv/Fm) pri obeh sortah. Ugotovili so, da sorta SG izkazuje tipičen stresni odziv, kjer pride po določenem času do indukcije antioksidativne obrambe, na kar je ta preobremenjena, kar nakazuje nižja TRAP vrednost. Na splošno so ugotovili, da ima hmelj višje TRAP vrednosti kot navadni fižol, kar bi lahko nakazovalo na višje celične koncentracije nizkomolekularnih antioksidantov. Rezultati so nakazali, da je sorta hmelja AU bolj tolerantna na sušo in izraža višjo regenerativno sposobnost v primerjavi s SG (Čerenak in sod., 2010).

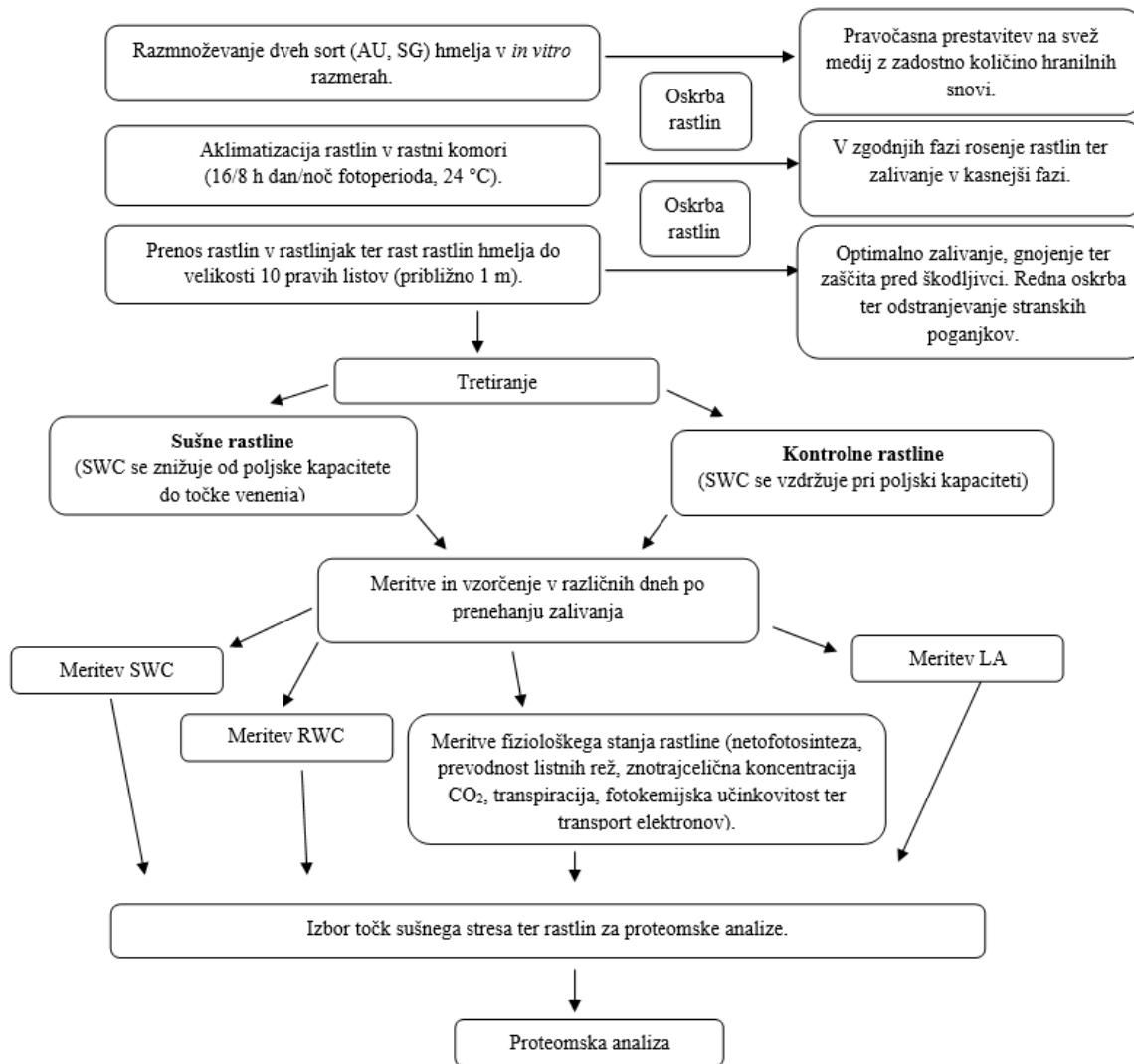
3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Rastlinski material za proučevanje sušnega stresa smo vzgojili iz rastlin hmelja sorti Aurora (AU) in Savinjski golding (SG), vzdrževanih v tkivni kulturi na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Sorta SG je avtohtona slovenska sorta, prenesena iz Anglije konec 19. stoletja in je poznana po fini hmeljni aromi ter prijetni in harmonični grenčici. SG ima nizko odpornost na primarno in srednjo odpornost na sekundarno okužbo hmeljeve peronospore, srednjo odpornost na hmeljevo pepelovko ter srednjo odpornost na blago obliko verticilijske uvelosti in nizko odpornost na letalno obliko verticilijske uvelosti. Sorta SG je srednje zgodnja sorta, ki kaže zelo dobro skladiščno obstojnost storžkov, pridelek se kaže med 1200 in 22000 kg/ha. AU je aromatična sorta, ki je rezultat žlahtnjenja na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije in zelo dobro sprejeta pri hmeljarjih, saj je bila do leta 2016 posajena v več kot polovici slovenskih hmeljišč. AU je srednje odporna na primarno okužbo in visoko odporna na sekundarno okužbo hmeljeve peronospore. Prav tako ima AU visoko odpornost na hmeljevo pepelovko, ter srednjo odpornost na blago obliko verticilijske uvelosti in nizko odpornost na letalno obliko verticilijske uvelosti. Sorta AU je srednje zgodna in ima zelo dobro skladiščno obstojnost storžkov ter ima pridelek med 1600 in 2400 kg/ha (IHPS, 2017).

3.2 POTEK POSKUSA

Na sliki 3 je prikazan shematičen potek poskusa, posamezne faze so podrobno razložene v nadaljevanju naloge.



Slika 3: Shema poteka poskusa.
Figure 3: Flowchart of the experiment.

Pri postavitev poskusa smo rastline hmelja izpostavili več stopnjam sušnega stresa ter pri tem stopnjo stresa ovrednotili z meritvami vsebnosti vode v substratu ter meritvami relativne vsebnosti vode v listih. Rastline smo vizualno opazovali ter zaporedno vzorčili več dni, ter pri tem pri vsaki rastlini izvedli fiziološke meritve. Vzorčili smo 1., 5., 9., 11., 18., 22. dan po izpostavitvi sušnemu stresu, v izbranih točkah smo na primerljivih rastlinah opravili proteomsko analizo.

3.3 PRIPRAVA RASTLIN

V zimskem času smo rastline razmnoževali z mikropropagacijo (z uporabo BAP (benzil amino purin) hormona), ob zadostni količini namnoženega materiala pa smo rastline prestavili na gojišča z IBA (indol maslena kislina) hormonom za ukoreninjenje. Ko so bile rastline primerno veliko, smo jih aklimatizirali v *in vivo* pogoje in prenesli v rastlinjak, kjer so bile vse do konca poskusa.

3.3.1 Gojišča za razmnoževanje in ukoreninjenje hmelja

Za pripravo gojišča smo v časo nalili približno 0,5 l destilirane vode in vanjo stresli 4,43 g MS (Murashige and Skoog, 1962) mikroelementov in makroelementov (basal salt medium - SIGMA), 20 g glukoze (SIGMA). Gojišču za iniciacijo brstov smo dodali 2 mg/l BAP hormona (citokinin), gojišču za koreninjenje pa 0,5 mg/l IBA hormona (avksin), umerili na 1 l ter umerili pH vrednost gojišča na 5.7 - 5.8. Po umeritvi pH vrednosti smo dodali še 7 g agarja (SIGMA) in ga postopoma raztopili v mikrovalovni pečici (približno 4 x po 2 minuti pri moči 800 W), da je raztopina postala bistra. Gojišče smo razdelili v epruvete ter jih pokrili s kovinskimi zamaški. Gojišča smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bar. Ko so se gojišča ohladila smo vanje v brezprašni komori s sterilno tehniko prenesli nodij z zalistnim brstom ter jih postavili v rastno komoro (sliki 4 in 5), z rastnimi pogoji 24 °C (+/- 2 °C) in fotoperiodo 16/8 - dan 16 ur in noč 8 ur.



Slika 4: Rastlinski material v tkivni kulturi v času rasti.
Figure 4: Plant material in tissue culture during growth time.

3.3.2 Aklimatizacija rastlin hmelja

Ko so bile rastline na gojišču z IBA dovolj ukoreninjene, smo jih nato prenesli v *in vivo* razmere v šotne tabletke znamke Valentin (premera 38 mm). Šotne tabletke smo predhodno za 10 min namočili v vodo in rastline zatem presadili vanje. V fazi aklimatizacije so rastline rastle v rastni komori (slika 6), kjer so bile najprej pokrite in smo jih dnevno škropili z vodo po nadzemnem delu, po 10-tih dneh smo jih odkrili ter pričeli z zalivanjem preko substrata. Sledila je posaditev rastlin v substrat za potaknjence+perlit proizvajalca Gramoflor (65 % bele šote, 20 % črne šote, 15 % perlita, 0,5 kg gnojila, zmes počasi sproščajočih mikroelementov-RADIGEN, vlažnostni reagent). Rastline smo prenesli v rastlinjak z delno uravnanimi rastnimi razmerami (nočna temperatura nad 5 °C), kjer je v nadaljevanju potekal poskus. Podatke o temperaturi in relativni vlagi smo spremljali z merilniki relativne vlage in temperature zraka Voltcraft DL-120TH (Conrad Electronic AG, Wollerau, CH), ki so beležili meritve na vsakih 15 minut od prestavitev rastlin iz rastne komore v rastlinjak do konca trajanja poskusa.

Rastline smo vzgojili do velikosti razvitih 10 pravih listov, med tem smo redno odstranjevali stranske poganjke, saj smo z rastjo le enega glavnega poganjka dosegali večjo izenačenost med rastlinami. Od prestavitve rastlin iz *in vitro* v *in vivo* razmere do prvega dne vzorčenja v poskusu je preteklo 70 dni, med katerimi smo rastline optimalno oskrbovali: zalivali, gnojili ter varovali pred boleznimi in škodljivci. Za gnojenje smo štirikrat uporabili gnojilo Kristalon start v odmerku 5 g/l. Za varstvo hmelja pred boleznimi in škodljivci smo uporabili sredstva: Aliette Flash (odmerek 2 kg/ha), Milbenock (1,5 l/ha), Vertimec Pro (1,25 l/ha), Actara 25 WG (100 g/ha), Systhane 20 EW (1,5 l/ha), Karate Zeon5 CS (0,25 l/ha). Vsa omenjena sredstva smo uporabili enkrat v času rasti rastlin.



Slika 5: Primer optimalne ukoreninjenosti *in vitro* vzgojenih rastlin pred presaditvijo v šotne tabletke (v *in vivo* razmere).

Figure 5: An example of optimal rooted *in vitro* grown plant before the transfer to Soak peat pellets (to *in vivo* conditions).



Slika 6: Rastline v fazi aklimatizacije v šotnih tabletkah, ob pričetku zalivanja preko korenin.
Figure 6: Plants during the aclimatisation in Soak Coco pellets, after starting watering through the roots.

3.4 TRETIRANJE RASTLIN

Optimalna oskrba rastlin hmelja nam je omogočila, da so rastline zelo izenačeno zrasle do velikosti 10 pravih listov (slika 8), na razpolago smo imeli 200 rastlin vsake sorte (AU in SG). Rastline smo razdelili v štiri obravnavanja.

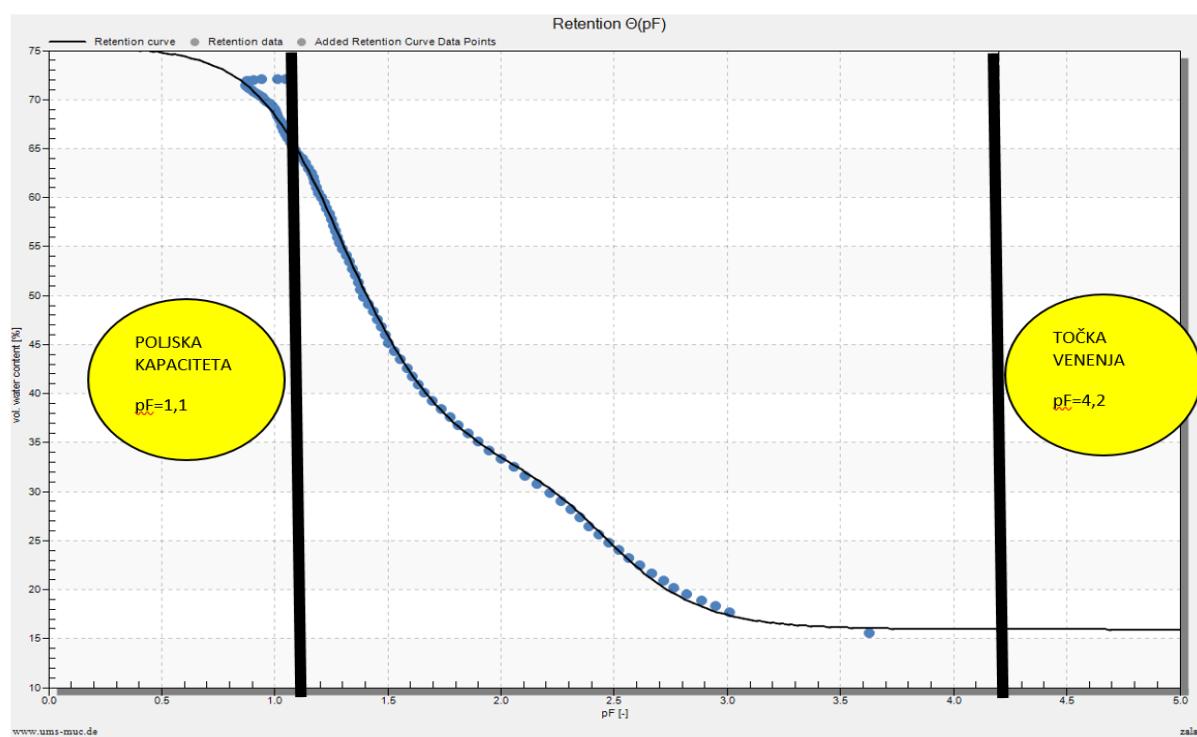
Obravnavanja v poskusu:

1. Aurora - sušne razmere (ang. drought) (AU_D)
2. Aurora - kontrola (ang. control) (AU_C)
3. Savinjski golding - sušne razmere (SG_D)
4. Savinjski golding - kontrola (SG_C)

Rastline smo tretirali tako, da smo jih polovico izpostavili sušnim razmeram, kar pomeni, da smo jih prenehali zalivati (po potrebi smo jih dolili vodo glede težo lonca in na željene

izračunane teže lonec, kar pomeni da smo dodali toliko ml vode kolikor gramov je lonec z rastlino tehtal manj od željene teže), drugo polovico rastlin pa smo še naprej optimalno zalivali. Znotraj vsakega obravnavanja smo opravili fiziološke meritve na 8 rastlinah, 4 najbolj izenačene glede rezultate na fizioloških meritev znotraj obravnavanj smo v nadaljevanju izbrali za proteomske analize.

Tekom poskusa smo na podlagi teh izračunov rastline v kontrolnih obravnavanjih vzdrževali glede na SWC pri vrednostih poljske kapacitete, rastline v sušnih razmerah pa smo s tehtanjem in dolivanjem z vodo do enake mase vzdrževali na enaki stopnji sušnega stresa. Tako smo dosegli izenačeno dostopnost vode za vse rastline hmelja (tudi če je velikost rastlin minimalno odstopala), izpostavljeni določeni stopnji sušnega stresa. Da smo med poskusom lahko nadzorovali razpoložljivost vode v substratu oz. dosegli željeno stopnjo suše, smo za uporabljeni substrat izmerili vodno retensijsko krivuljo. Te meritve so bila opravljene z napravo HYPROP (UMS-MUC, München) na katedri za pedologijo in varstvo okolja na Biotehniški fakulteti. Slika 7 prikazuje graf vsebnosti vode pri različnih pF vrednostih. Točka venenja (17,11 vol. %) je bila določena pri pF vrednosti 4,2. Poljsko kapaciteto (64,2 vol. %) smo določili pri popolnoma omočenem substratu (odvečna voda je odtekla). Pri tem smo uporabili tudi podatke o gostoti substrata, ki je bil povprečno $0,195 \text{ g/cm}^3$, masa suhega substrata (brez vode) je bila 288,2 g. Na podlagi omenjenih podatkov smo s sklepnim računom izračunali težo lonec pri različnih SWC vrednostih.



Slika 7: Vodno retensijska krivulja substrata, ki smo ga uporabili v poskusu.
Figure 7: Water retention curve of the substrate, used in the experiment.

Tekom poskusa smo na podlagi teh izračunov rastline v kontrolnih obravnavanjih vzdrževali glede na SWC pri vrednostih poljske kapacitete, rastline v sušnih razmerah pa smo s tehtanjem in dolivanjem z vodo do enake mase vzdrževali na enaki stopnji sušnega stresa. Tako smo dosegli izenačeno dostopnost vode za vse rastline hmelja (tudi če je velikost rastlin minimalno odstopala), izpostavljeni določeni stopnji sušnega stresa.

Ko smo rastline presadili v zadnjo velikost loncev (1,4 L), smo poleg presajenih rastlin pripravili tudi 10 loncev z enako maso substrata, ki je bil tudi enako zbit (imel enako gostoto substrata) kot ostali v poskusu. Glede na krivuljo na sliki 7, smo določili poljsko kapaciteto, točko venenja, izmerili pa smo tudi gostoto substrata. Glede na maso lonca pri poljski kapaciteti (največji količini vode, ki jo je substrat možen zadržati) smo preračunali teže loncev pri drugih vol. % vode v substratu, ter se z zalivanjem in z določitvijo mase lončkov približali izračunanim odstotkom. In sicer smo predvidevali vse rastline v kontrolnih pogojih pri vsebnosti vode v substratu pri 64 vol. %, po drugi strani pa smo rastlinah v suši žeeli zmanjševati vsebnost vode v substratu z vsako točko vzorčenja in kot je natančneje razloženo v shemi vzorčenja v nadaljevanju. Pri merjenju celotne mase lončkov smo upoštevali maso lončka, maso substrata ter maso trstike – opore rastline. Masa rastline je bila precej manjša in smo jo zanemarili oz. privzeli, da je med lonci praktično izenačena. Meritve mase smo opravili na vseh loncih sušnega tretmaja (1. in 3. obravnavanje) ter maso loncev prilagodili tako, da smo v tiste lonce, ki so bili prelahki dolili toliko ml vode, kolikor gramov je lonec premalo tehtal (glede na težo drugih loncev). Na ta način smo izenačili mase loncev v obravnavanjih, kjer vzdrževali sušne razmere. Po drugi strani pa smo rastline v kontrolnih obravnavanjih prekomerno zalili ter počakali, da je odvečna voda odtekla ter tako zagotavljali zadrževanje vode pri poljski kapaciteti.

Vzorčenje je potekalo po sledeči shemi:

Točka 0 → prvi dan po zadnjem zalivanju rastlin v sušnih razmerah (AU_D, SG_D), ko je bilo pri vseh rastlinah stanje vode v substratu (SWC) pri poljski kapaciteti (okvirno 64 vol. %)

Točka 1 → 6 dni od zadnjega zalivanja rastlin v sušnih razmerah, kjer smo vzdrževali SWC pri okvirno 50 vol. %. Kontrolne rastline so bile ves čas optimalno zalite, to je pri SWC 64 vol. %; AU_C, SG_C, kar velja tudi za vse ostale točke.

Točka 2 → 10 dni od zadnjega zalivanja rastlin v sušnih razmerah, kjer smo vzdrževali SWC pri okvirno 40 vol. %.

Točka 3 → 12 dni od zadnjega zalivanja rastlin v sušnih razmerah, kjer smo vzdrževali SWC pri okvirno 30 vol. %.

Točka 4 → 19 dni od zadnjega zalivanja rastlin v sušnih razmerah, kjer smo vzdrževali SWC pri 20 vol. %.

Točka 5 → 23 dni od zadnjega zalivanja rastlin v sušnih razmerah, kjer smo vzdrževali SWC pri 17 vol. %, kar ustreza točki venenja za uporabljen substrat.

V vsaki točki smo opravili vzorčenja ter meritve 8 rastlin iz vsakega obravnavanja, kar je skupno pomenilo 32 rastlin v enem dnevu. Vzorčenje se je pričelo ob 8.00 in je trajalo do 14.00 ter je potekalo tako, da smo izmenično vzorčili rastline različnih obravnavanj. Rastlini, ki smo jo vzorčili, smo najprej izmerili prevodnost listnih rež, transpiracijo, neto-fotosintezo ter fotokemično učinkovitostz aparatom Li6400xt (LiCor, Lincoln, NE ZDA), kasneje smo porezali vse liste ter jih fotografirali za določitev listne površine (LA). Fotografiranje listov je potekalo tako, da smo na bel list z milimeterskim papirjen označili del lista (za kasnejšo računalniško analizo fotografij), na list pa smo zložili vse liste z rastline hmelja, ki smo jih s škarjami rezali s stebla. Če je bilo listov več, smo za eno rastlino naredili 2 do 3 fotografije, tako da smo zajeli vse liste. Izmerili smo tudi vodni potencial, odvzeli list za merjenje relativne vsebnosti vode (RWC) ter reprezentativni vzorec substrata za merjenje vsebnosti vode v substratu (SWC). S tekočim dušikom smo zamrznili vse preostale prave liste ter jih shranili na -70 °C. Po končanih vzorčenjih vseh točk smo na podlagi rezultatov fizioloških meritve izmed 8 rastlin izbrali vzorce štirih za proteomske raziskave.



Slika 8: Rastline hmelja z razvitimi 10 listi ob pričetku tretiranja.
Figure 8: 10 leaf hop plants in the beginning of the treating.

3.5 FIZIOLOŠKE MERITVE RASTLIN IN SUBSTRATA

3.5.1 Vsebnost vode v substratu

Med vzorčenjem smo v vsakem loncu vzorčenih rastlin odvzeli vzorec substrata ter ga stehtali, da smo dobili maso svežega substrata (Fw), maso suhega substrata (Dw) pa smo dobili po sušenju na 105 °C po 24 urah. Vsebnost vode v substratu smo izračunali po enačbi 1.

$$\text{SWC (vol. \%) = } [(Fw - Dw)/Dw] \times 100 \quad \dots (1)$$

3.5.2 Določanje vodnega statusa rastline

Za določanje vodnega statusa rastline smo merili relativno vsebnost vode na 4. pravem listu od zgoraj navzdol ter izmerili vodni potencial na nasprotnem listu. S tehtanjem sveže odrezanega lista smo izmerili maso svežega lista (Fw), nakar smo ga dali v petrijevko, na filter papir prepojen z destilirano vodo, ter petrijevke za 24 ur pustili na dnevni svetlobi. Po tem času smo izmerili maso hidriranega lista, to je t.i. turgidna masa (Tw). List smo ponovno stehtali po 24 urnem sušenju pri 70 °C in s tem določili maso suhega lista (Dw). Relativno vsebnost vode v listih smo izračunali po enačbi 2.

$$\text{RWC (\%) = } [(Fw - Dw)/(Tw - Dw)] \times 100 \quad \dots (2)$$

Vodni potencial smo izmerili s Scholanderjevo komoro (Tlačna komora; chamber 3005-1223, Soil Moisture Equipment Corp., Goleta, ZDA) (Scholander in sod., 1964).

3.5.3 Meritve fizioloških parametrov

Fiziološke parametre rastlin smo merili z merilnim sistemom Li-6400xt (LI-COR biosciences, Lincoln, ZDA). Merili smo pri referenčni koncentraciji CO₂ 380 µmol mol⁻¹, saturacijski svetlobni jakosti PPFD = 1000 µmol m⁻² s⁻¹, temperaturi 25 °C in okoljski vlagi. Naprava je bila uporabljena za meritve parametrov: neto fotosinteza (An), stomatalna prevodnost (g_s), znotrajcelična koncentracija CO₂ (C_i) ter transpiracija (E). Izmerili smo tudi fotokemijsko učinkovitost (Fv'/Fm') ter hitrost toka elektronov v svetlobnih reakcijah (ETR). Vse omenjene meritve so bile narejene na 4. listu od zgoraj navzdol. Isti list smo zatem uporabili za meritve vodnega potenciala s Scholanderjevo komoro. Paralelni list pa smo uporabili za proteomsko analizo. Sledilo je rezanje vseh listov rastline, ki smo jih zložili na bel papir in fotografirali (slika 9). V nadaljevanju smo s fotografsko analizo (s programom

Cell Sens Dimension 1.6, Olympus) ovrednotili celotno listno površino (LA) le pri tistih rastlinah, katerih vzorce smo uporabili v proteomski analizi.



Slika 9: Primeri listov posamezne rastline vseh štirih obravnavanj, 22 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu za določitev listne površine (LA).

Figure 9: Examples of individual plant leaves in all four treatments, 22 days after drought stress treatment for leaf area (LA) determination.

3.5.4 Statistična analiza podatkov fizioloških parametrov

Linearni model smo uporabili za analizo razlik v povprečjih SWC in RWC. Proučevali smo vpliv treh dejavnikov in sicer: tretiranja (torej suši izpostavljeni (D) in kontrolne rastline (C)), sorte (AU in SG), čas (DSS) ter njihove interakcije. Testi linearnih kontrastov so bili uporabljeni kadar so rezultati pokazali statistično značilno interakcijo. Fiziološki parametri so bili analizirani glede na vrednosti SWC med poskusom. V ta namen smo SWC vrednosti razdelili v 4 razrede: SWC je < 10%, 10-20%, 20-30% in >30%. Vpliv SWC in sorte ter njune interakcije na fiziološke parametre so bili analizirani z linearnim modelom, upoštevajoč heteroskedastičnost spremenljivk med obravnavanji. V nadaljevanju smo naredili analizo kontrastov, da smo lahko primerjali različne pare povprečij fizioloških parametrov. Model linearne regresije je bil uporabljen za ugotavljanje odvisnosti netofotosinteze od stomatalne prevodnosti ter SWC. Vse analize so bile opravljene v statističnem programu R (R Core Team, 2015).

3.5.5 Izbor rastlin za proteomske raziskave

Izmed 5 točk vzorčenja smo izbrali 3 točke (11 DSS, 18 DSS in 22 DSS), kjer se je na podlagi rezultatov fizioloških meritev najbolj pregledno videlo stopnjevanje sušnega stresa pri sušnih obravnavanjih ter čim večje razlike med rastlinami v sušnih razmerah in kontrolnimi rastlinami. Izmed 8 rastlin v vsakem obravnavanju smo izbrali 4 najbolj izenačene rastline po fizioloških parametrih, ki so predstavljale 4 biološke ponovitve oskusa za proteomsko analizo.

3.6 PROTEOMSKA ANALIZA

3.6.1 Ekstrakcija proteinov

Ekstrakcijo proteinov smo naredili kot so opisali Wang in sod. (2006). List smo zmeli v terilnici s tekočim dušikom v fin prah ter v nadaljevanju uporabili 0,3 g prahu v mikrocentrifugirki. V mikrocentrifugirko smo dodali 10-% raztopino triklorocetne kisline (TCA) v acetenu. Po 3 minutnem centrifugiranju pri 16 000 g smo odstranili supernatant ter dopolnili do vrha z raztopino (80-% metanol; 0,1 M amonijev acetat). Ponovili smo centrifugiranje in ponovno odstranili supernatant, nato smo dopolnili mikrocentrifugirko do vrha z 80 % acetonom. Ponovno smo centrifugirali ter odstranili ves supernatant. Sledila je ekstrakcija z dodatkom mešanice fenol (pH=8)/SDS pufer (1:1), po centrifugiranju pa smo uporabili le fenolno fazo ter jo oborili s raztopino (100-% metanol; 0,1 M amonijev acetat). Oborino smo čez noč inkubirali na -20 °C. Naslednji dan smo centrifugirali ter odstranili supernatant, vidni beli oborini pa smo dodali 100 % metanol za izpiranje. Sledila je odstranitev supernatanta ter dodajanje 80 % acetona. Po ponovnem centrifugiranju ter odstranjevanju supernatanta smo oborino posušili ter raztopili v pufru DIGE. Sestava raztopin, ki so bile uporabljeni pri ekstrakciji proteinov so zapisane v preglednicah (preglednica 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Preglednica 3: Priprava raztopine 10-% (v/v) TCA v acetenu.
Table 3: Preparation of 10 % TCA in acetone solution.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija (v/v)
TCA (Merck)	13 g	10 % (w/v)
ddH ₂ O do 100 ml		

Preglednica 4: Priprava raztopine (80 -% (v/v) metanol; 0,1 M amonijev acetat).
Table 4: Preparation of 80 % methanol with 0,1 M ammonium acetate solution.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Amonijev acetat (Sigma)	13 g	0,1 M
Metanol (Sigma)	80 ml	80 % (v/v)
ddH ₂ O do 100 ml		

Preglednica 5: Priprava raztopine raztopine (80-% (v/v) aceton).
Table 5: Preparation of 80 % acetone solution.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija (v/v)
Aceton (Sigma)	80 ml	80 %
ddH ₂ O do 100 ml		

Preglednica 6: Priprava pufra SDS.
Table 6: Preparation of SDS buffer.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Saharoza (Sigma)	15 g	30 % (w/v)
SDS (Sigma)	1 g	2 % (w/v)
Tris-HCl 1 M (pH=8)	5 ml	0,1 M
2-merkaptetoetanol (Sigma)	2,5 ml	5 % (v/v)
ddH ₂ O do 50 ml		

Preglednica 7: Priprava raztopine (100-% metanol; 0,1 M amonijev acetat).
Preglednica 7: Preparation of 100 % methanol with 0,1 M ammonium acetate solution.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Amonijev acetat (Merck)	2,31 g	0,1 M
Metanol do 300 ml		

Preglednica 8: Priprava pufra DIGE.
Table 8: Preparation of DIGE buffer.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris (Sigma)	54,6 mg	30 mM
Urea (Sigma)	6,30 g	7 M
Tiourea (Merck)	2,28 g	2 M
CHAPS (Merck)	0,60 g	4 % (v/v)
ddH ₂ O do 15 ml, pH=8		

Koncentracijo proteinov smo izmerili z 2D-Quant kitom (GE Healthcare), ki vsebuje komplet reagentov (precipitant, ko-precipitant ter bakrovo raztopino). Za merjenje koncentracije proteinov smo najprej pripravili umeritveno krivuljo, kjer smo raztopili 0, 10, 20, 30, 40 ter 50 µg BSA standarda iz standardne raztopine s koncentracijo 2 µg/µl. Nato smo pripravili vzorce proteinov (4 µl), ki smo jih oborili ter resuspendirali v raztopini bakrovih ionov. Dobljenim standardom in vzorcem smo s spektrofotometrom izmerili

absorbanco pri valovni dolžini 480 nm. Dobljene vrednosti absorbance smo vnesli v enačbo umeritvene krivulje ter izračunali koncentracije proteinov v vzorcih.

3.6.2 Označevanje proteinov za 2D-DIGE analizo

Vzorce za analizo 2D-DIGE smo označili s fluorescentnimi barvili (CyDye fluor min kit, GE Healthcare) pred izoelektričnim fokusiranjem. Ko smo vzorcem določili koncentracijo proteinov, smo le-te razredčili na koncentracijo 2 mg/ml ter uporabili 12,5 µl tako pripravljenega vzorca. Poleg tega smo pripravili tudi interni standard tako, da smo naredili mešanico vseh vzorcev po 12,5 µl, dobro premešali ter potem nazaj alikvotirali po 12,5 µl. Tako pripravljenim vzorcem smo dodali 0,5 µl fluorescentnega barvila in sicer smo polovico vzorcev označili s Cy3, polovico s Cy5, interni standard pa s Cy2 z izključevanjem možnosti preferenčnega označevanja. Po 30-minutni inkubaciji na ledu smo dodali 1 µl 10 mM lizina ter združili vzorce (Cy2, Cy3 ter Cy5) nakar smo dodali enak volumen 2x vzorčnega pufra. Preglednici 9 in 10 prikazujeta pripravo raztopin za označevanje proteinov s fluorescentnimi barvili.

Preglednica 9: Priprava 10 mM lizina.

Table 9: Preparation of 10 mM lysine.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Lizin (Merck) ddH ₂ O do 10 ml	18 mg	10 mM

Preglednica 10: Priprava 2x vzorčnega pufra.

Table 10: Preparation of 2x sampling buffer.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	2,10 g	7 M
Tiourea (Merck)	0,76 g	2 M
CHAPS (Merck)	0,20 g	4 % (w/v)
Pharmalyte 3-10 (Merck)	100 µl	2 % (v/v)
DTT (Merck)	100 mg	2 % (w/v)
ddH ₂ O do 5 ml		

3.6.3 Izoelektrično fokusiranje

Uporabili smo 24 cm IPG (ang. immobilised pH gradient) trakove (pH = 3-11 NL, GE Healthcare). Trakove smo najprej čez noč rehidrirali v 450 µl rehidracijskega pufra (preglednica 11) z DeStreak reagentom (GE Healthcare). Vzorce smo nanesli s pomočjo vzorčnih posodic.

Izoelektrično fokusiranje je potekalo po sledečih pogojih:

- 150 V, 3h
- 300 V, 3 h
- gradient do 1000 V, 6 h
- gradient do 10000 V, 3 h
- 10000 V, 3 h

Po končanem izoelektričnem fokusiraju smo trakove shranili v plastični mapi pri -80 °C ali pa jih takoj uporabili za uravnoteženje.

Preglednica 11: Priprava rehidracijskega pufra z DeStreak reagentom.

Table 11: Preparation of rehydration buffer with DeStreak reagent.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	2,10 g	7 M
Tiourea (Merck)	0,76 g	2 M
CHAPS (Merck)	0,10 g	2 % (w/v)
IPG Buffer (Merck)	25 µl	0,5 % (v/v)
DeStreak reagent (Merck)	60 µl	1,2 % (v/v)
1 % bromfenol modro (Sigma)	10 µl	0,002 (v/v)
ddH ₂ O do 5 ml		

3.6.4 Uravnoteženje

Pred prenosom na poliakriamidni gel smo trakove uravnotežili s pufrom za uravnoteženje. V epruveto smo dodali fokusirane trakove ter 10 ml pufra za uravnoteženje 1 (preglednica 12), nakar smo inkubirali z rahlim stresanjem 20 minut pri sobni temperaturi. Pufer za uravnoteženje 1 smo zatem odlili ter dodali pufer za uravnoteženje 2 (preglednica 13) ter ponovno inkubirali s stresanjem 20 minut pri sobni temperaturi. Pufer za uravnoteženje 2 smo nato odlili, trakove pa položili na filter papir, ki je popivnal odvečno tekočino.

Preglednica 12: Priprava pufra za uravnoteženje 1.

Table 12: Preparation of equilibration buffer 1.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	36 g	6 M
Tris-HCl (1,5 M, pH=8,8)	5 ml	75 mM
Glicerol (Sigma)	30 ml	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
DTT (Merck)	1 g	1 % (w/v)
ddH ₂ O do 100 ml		

Preglednica 13: Priprava pufra za uravnoteženje 2.
Table 13: Preparation of equilibration buffer 2.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	36,0 g	6 M
Tris-HCl (1,5 M, pH=8,8)	5 ml	75 mM
Glicerol (Sigma)	30 ml	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2,0 g	2 % (w/v)
Jodoacetamid (Merck)	2,5 g	2,5 % (w/v)
ddH ₂ O do 100 ml		

3.6.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti Na-dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti Na-dodecil sulfata (SDS-PAGE) je potekala na 12,5 % poliakrilamidnem gelu (preglednica 14) na gelu velikosti 20 x 26 cm.

Preglednica 14: Priprava 12,5 % poliakrilamidnega gela za 2D elektroforezo.
Table 14: Preparation of 12,5 % polyacrylamide gel for 2D electrophoresis.

Sestavina	Količina
ddH ₂ O	63,3 ml
Akrilamid/biskriamid (37,5:1) (Sigma)	46,8 ml
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	37,5 ml
10 % SDS (Sigma)	1,5 ml
TEMED (Merck)	51 µl
10 % APS (Sigma)	0,75 ml

IPG trakove smo nanesli na tako pripravljene gele ter prekrili z 2 ml agarozne raztopine. Elektroforezo smo izvedli pri pogojih:

- 10 mA/ gel, 1 h
- 40 mA/ gel dokler fronta barvila ni dosegla konca gela

Pri tem je bila temperatura hladilne vode v kopeli nastavljena na 25 °C, s čimer smo hladili pufer v elektroforezi.

Po končani elektroforezi smo gele slikali s čitalcem Ettan DIGE Imager (GE Healthcare), kjer smo za vsak gel naredili po 3 slike (za vsako uporabljeno fluorescentno barvilo). Ekspozicijski čas smo prilagodili tako, da smo dosegali čim višji signal, kljub temu pa nobena proteinska lisa ni dosegla zasičenosti.

3.6.6 Preparativna elektroforeza

Za pripravo preparativnega gela smo pripravili dva gela, na katera smo nanesli 600 µg proteinov, ki pa je bila zmes vseh vzorcev tako kot interni standard. Sicer je preparativna

elektroforeza potekala enako kot prej opisana dvodimenzionalna elektroforeza, z razliko, da smo vzorec pri izoelektričnim fokusiranjem nanesli na IPG trakove z nanosom rehidracijskega pufra, da je izoelektrično fokusiranje je potekalo pri drugih pogojih, saj nismo nanašali vzorca preko vzorčnih posodic ampak z rehidracijskim pufrom in da smo pri preparativni elektroforezi uporabili drugo barvilo.

Izoelektrično fokusiranje za preparativno elektroforezo je potekalo po protokolu:

- 300 V; 1h
- 500 V; 1 h
- gradient do 1000 V; 1,25 h
- gradient do 10000 V; 1,65 h
- 10000 V; 3,19 h

2D elektroforeza je potekala pri enakih pogojih kot je opisano v prejšnjih poglavjih. Po končani elektroforezi smo pred vlivanjem gela tretirali manjšo stekleno ploščo z "BindSilane" raztopino (3 ml) (priprava je opisana v preglednici 15). Ko se je "BindSilane" na steklih posušil smo dodali referenčne markerje za izrezovanje spotov na Ettan DIGE Spot pickerju (GE Healthcare).

Preglednica 15: Priprava "BindSilane" raztopine za fiksacijo.

Table 15: Preparation of "BindSilane" solution for fixation.

Sestavina	Količina
Etanol (Sigma)	8 ml
Oacetna kislina (Sigma)	0,2 ml
ddH ₂ O	1,8 ml
BindSilane (GE Healthcare)	10 µl

Po končani preparativni elektroforezi smo gele barvali s koloidalnim coomassie barvilm (CBB G-250). Najprej smo gele fiksirali za 3 ure (preglednica 16), jih sprali z vodo (3 krat po 20 minut), ter naredili predinkubacijo (preglednica 17) za 1 uro. Za tem smo dodali 0,35 g CBB G-250, barvali z mešanjem 5 dni ter nato sprali delce z vodo.

Preglednica 16: Raztopina za fiksacijo preparativnega gela.

Table 16: Fixation solution for preparative gel.

Sestavina	Količina
Etanol (Sigma)	30 ml
Fosforna kislina (Sigma)	75 ml
ddH ₂ O do 1 l	

Preglednica 17: Raztopina za predinkubacijo.
Table 17: Pre-incubation solution.

Sestavina	Količina
Amonijev sulfat (Sigma)	340 g
Fosforna kislina (85 %) (Sigma)	60 ml
Metanol (Sigma)	680 ml
ddH ₂ O do 2 l	

Analizo slik gelov smo opravili s programom DeCyder 6.5 (GE Healthcare). Detekcijo vseh lis smo analizirali v obeh sortah skupaj, kjer smo najprej zaznali in uskladili lise z modulom DIA (Differential In-gel Analysis) (ki temelji na kvantifikaciji proti linearному standardу) ter kasneje z BVA (angl. Biological Variation Analysis) (ki omogoča usklajevanje med geli ter primerjalno analizo). Podatke smo tudi ročno pregledali ter po potrebi tudi ročno uskladili. Kvantitativno smo podatke analizirali z dvosmerno ANOVO ($p < 0,001$) s faktorjem: tretiranje (sušne/kontrolne razmere) in čas trajanja suše (DSS). Tako smo določili proteine, ki se statistično značilno razlikujejo med rastlinami v kontrolnih in sušnih razmerah skozi vse časovne točke in tudi glede na sorto. Identificirani so bili statistično značilni proteini ($p < 0,01$), podatki pa so prikazani posamezno glede na sorto.

3.6.7 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

Za identifikacijo smo pripravili ter izrezali 44 proteinskih lis z gela z robotskim izrezovalnikom Ettan Spot Picker (GE Healthcare). Analiza z masno spektrometrijo je bila opravljena v Yorku na Univerzi v Helsingtonu, na Oddelku za biologijo, FAO Proteomics Lab, Velika Britanija. Najprej so opravili redukcijo z DTE in S-karbamidometilacijo z jodoacetamidom, sledila pa je tripsinska razgradnja v gelu. Koščki gela so bili dvakrat sprani s 50 % (v:v) acetonitrilom v vodi s 25 mM amonijevim bikarbonatom, nato sprani z acetonitrilom ter posušeni v vakumskem koncentratorju. Modificiran prašičji tripsin (Promega) so raztopili v 50 mM ocetni kislini ter ga nato 5-krat redčili z amonijevim bikarbonatom (25 mM), tako da je bila končna koncentracija tripsina 0,02 µg/µl. Koščki gela so bili rehidrirani z dodatkom 10 µl raztopine tripsina, po 10 minutah pa je bila dodana zadostna količina 25 mM amonijevega bikarbonata, da so bili koščki gela pokriti s tekočino. Sledila je inkubacija preko noči na 37 °C ter ekstrakcija peptidov. Od vsake mešanice peptidov so 1 µl nanesli na jekleno MALDI tarčo ter dodali enak volumen sveže pripravljene 4-hidroksi-α-ciano-cimetove kisline (5 mg/ml, Sigma) v raztopini 50 % vode in acetonitrila (v/v), z dodatkom 0,1 % trifluoroacetne kisline (v/v). Masne spektre (MALDI v pozitivnem načinu) so pridobili z uporabo masnega spektromетra Bruker UltraFlex III z reflektrom. Masne spektre so posneli v območju 800 – 5000 m/z. Masni spektri so bili zunanje kalibrirani na zmes 6 peptidov (des-Arg¹-Bradykinin, 904.681; Angiotensin I, 1296.685; Glu¹-Fibrinopeptide B, 1750.677; ACTH (1-17 clip), 2093.086; ACTH (18-39 clip), 2465.198; ACTH (7-38 clip), 3657.929). Za vsako proteinsko liso so nato izbrali deset najmočnejših

vrhov (S/N večji od 30), ki so bili uporabljeni za MS/MS fragmentacijo. Fragmentacija je bila izvedena z načinom LIFT brez kolizijskega plina. Uporabili so privzeto kalibracijo za MS/MS spektre. Za obdelavo spektrov in generiranje liste vrhov je bila uporabljena programska oprema Bruker flexAnalysis software (verzija 3.3).

3.6.8 Bioinformatska analiza podatkov masnega spektra

Pridobljene podatke masne spektrometrije smo združili v datoteke formata mgf (Macot generic format), ki so služile kot vhodni podatki za iskanje zadetkov v programu MACOT (Matrix Science Ltd., verzija 2.4) MS/MS Ions Search z uporabo baze podatkov NCBInr. Za iskanje so bili uporabljeni parametri: encim trypsin, največ eno dovoljeno zgrešeno mesto cepitve, fiksna modifikacija je bila karbamidometilacija cisteinov (C), variabilna modifikacija oksidacija metioninov (M) ter deaminacija (NQ), toleranca pri meritvah mas peptidov 0,5 Da ter naboj peptidov 1 +. Za potrditev pravilnega iskanja v programu MASCOTu smo uporabili MASCOT oceno (score), število ujemanj peptidov, pokritost zaporedja, pI in molekulsko maso. V primeru, da zadetka v bazi podatkov NCBInr nismo uspešno našli, smo iskanje izvedli še v bazi podatkov Plant_EST z enakimi prej opisanimi parametri. Tako pridobljena EST sekvenca je bila uporabljena za iskanje homolognih proteinov z uporabo BLASTP algoritma. Za določanje funkcije proteinov smo uporabljali bazo podatkov Uniprot z akcijsko številko, ki pripada proteinu.

Vse statistično značilne proteine smo glede na dneve po izpostavitvi sušnemu stresu (DSS) uvrstili v blagi, srednji in močan sušni stres in rezultate prikazali v obliki vennovih diagramov. Tiste proteine, ki smo jih identificirali, smo uvrstili v različne skupine s skupno funkcijo v rastlinah ter jih prikazali v tortnem diagramu glede na to kolikšen delež vseh identificiranih proteinov je v kakšni skupini.

4 REZULTATI

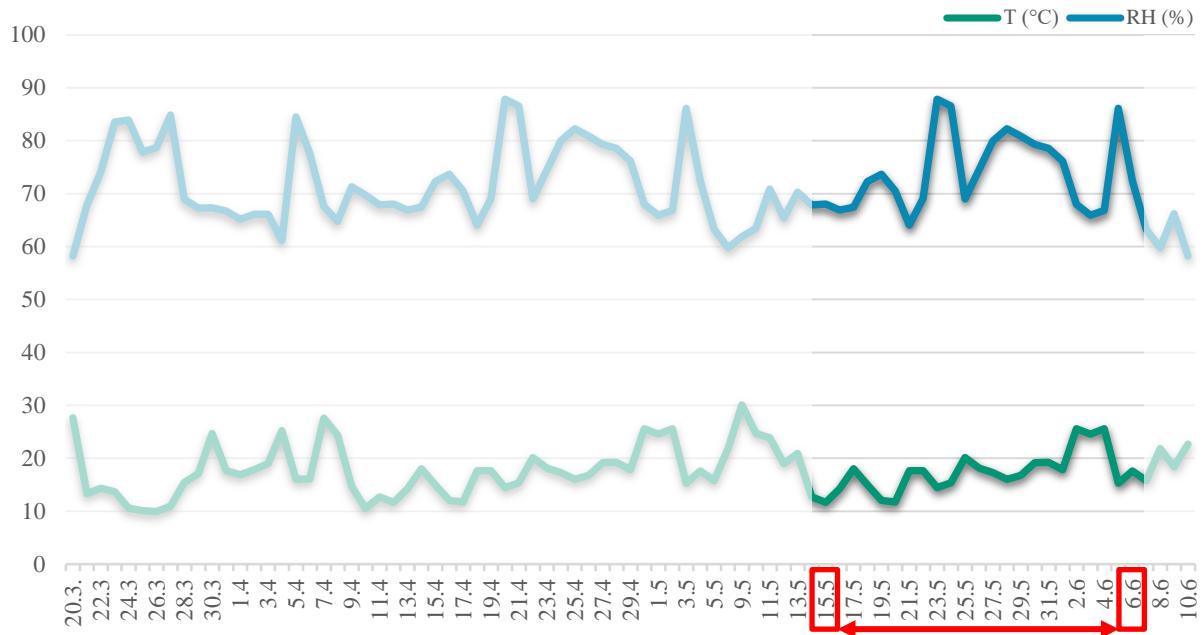
4.1 RAZMERE V RASTLINJAKU TER VODNO RETENZIJSKE LASTNOSTI SUBSTRATA

Na sliki 11 je predstavljen graf s povprečnimi dnevнимi temperaturami ter s povprečno dnevno relativno vlago v rastlinjaku. V rastlinjaku smo imeli dva merilnika vlage in temperature, nameščena v razmaku 7 metrov (slika 10). Podatki na obeh zapisovalnikih so bili zelo primerljivi, zaradi česar smo podatke združili in izračunali povprečne dnevne vrednosti za temperaturo in relativno zračno vlago.



Slika 10: Rastline hmelja po aklimatizaciji v rastlinjaku. Na sliki sta z rdečim krogcem označena merilnika vlage in temperature v rastlinjaku.

Figure 10: Hop plants after the aclimatisation in the greenhouse. In the figure, the humidity and temperature sensors are marked with red circles.



Slika 11: Povprečna dnevna temperatura ter povprečna dnevna relativna vlaga v rastlinjaku. Rdeče označena okvirčka prikazujeta čas od začetka do konca vzorčenja.

Figure 11: Average daily temperature and average daily relative humidity in the greenhouse. The red coloured circle indicates the time from the beginning to the end of sampling.

Rezultati na sliki 9 kažejo, da povprečne dnevne temperature niso presegale vrednosti 30°C , pod vrednost 10°C so redko padle. S slike 9 so razvidne temperature v rastlinjaku med samim vzorčenjem, ki je trajalo od 15. 5. 2014 do 6. 6. 2014 (rdeči oznaki na sliki 11). Razvidno je, da so temperature po 2. 6. 2014 malo narasle, vendar v mejah, ki smo si jih zastavili. Povprečna dnevna relativna vlaga v rastlinjaku se je gibala od 55 % pa tja do 90 %.

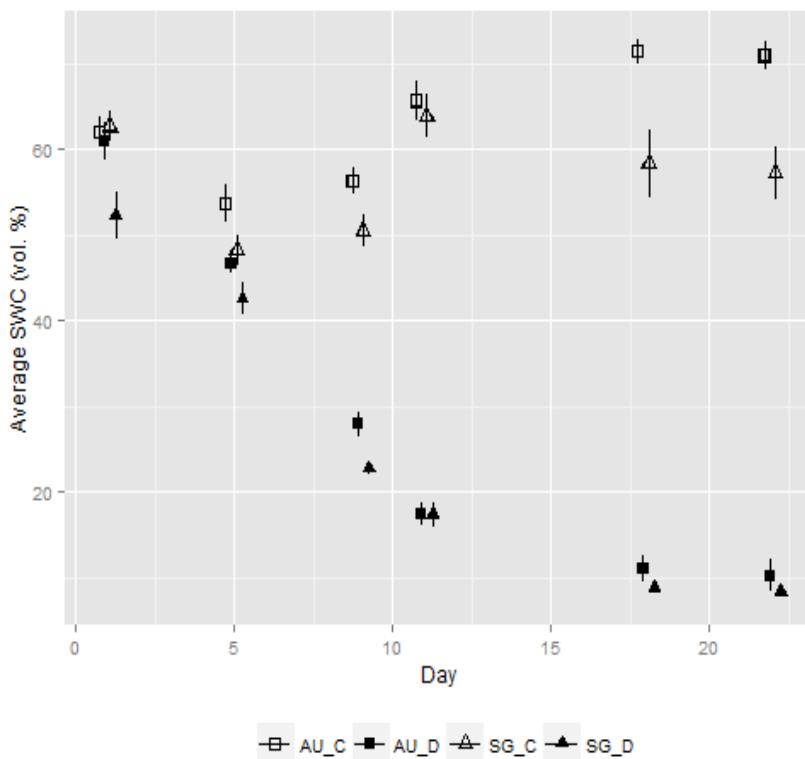
4.2 VSEBNOST VODE V SUBSTRATU

Ob izpostavljanju rastlin hmelja sušnim razmeram so se 1. dan po izpostavitvi sušnemu stresu (dan sušnega stresa; DSS) SWC vrednosti gibale med 52 in 63 vol. %. Med poskusom smo dosegli, da so se SWC vrednosti pri rastlinah v kontrolnih razmerah gibale med 48 in 72 vol. %. Skozi celoten potek poskusa med vsemi rastlinami, ki so rasle v kontrolnih razmerah, ni bilo statistično značilnih razlik. Za rastline, ki smo jih postopoma izpostavili sušnemu stresu, smo izračunali, da se je substrat povprečno sušil 9 % na dan (s 95 % intervalom zaupanja med 8,4 % do 10,1 %). Povprečne SWC vrednosti kontrolnih rastlin so bile pri sorti AU manj variabilne kot pri sorti SG, statističnih razlik v SWC obravnavanj AU in SG pa nismo potrdili. Prve statistično značilne razlike med rastlinami v kontrolnih

razmerah ter rastlinami v sušnih razmerah so bile v 9 DSS ($p=0,0000$) pri obeh sortah. V 9 DSS je SWC vrednost v substratu suši izpostavljenih rastlin padla za približno polovico vrednosti, ki smo jo v tem dnevu zabeležili pri rastlinah v kontrolnih razmerah. Pri SG so imele suši izpostavljene rastline 28,8 vol. % vrednost SWC, rastline v kontrolnih razmerah pa 50,5 vol. %, medtem ko so pri AU imele suši izpostavljene rastline 28,0 vol. %, rastline v kontrolnih razmerah pa 56,4 vol. %. Substrat smo želeli sušiti postopoma od poljske kapacitete (64,2 vol. %) do točke venenja (17,1 vol. %), kar nam je uspelo, saj smo na zadnji dan vzorčenja (22 DSS) dosegli SWC vrednosti substrata za suši izpostavljene rastline 8,4 vol % za SG in 10,4 vol. % za AU (glej tudi sliko 12 in preglednico 16).

Preglednica 16: Vsebnost vode v substratu (SWC) med poskusom. N = 8, sd = standardna deviacija.
Table 16: Relative soil water content (SWC) during the experiment. N = 8, sd = standard deviation.

Obravnavanje	Dan	Sorta	Kontrola/ Suša	Povprečna vrednost SWC (vol. %)	sd
AU_C	1	AU	C	62,1	1,6
AU_D	1	AU	D	60,9	2,2
SG_C	1	SG	C	62,7	1,8
SG_D	1	SG	D	52,2	2,8
AU_C	5	AU	C	53,7	2,3
AU_D	5	AU	D	46,7	1,1
SG_C	5	SG	C	48,2	1,8
SG_D	5	SG	D	42,6	1,9
AU_C	9	AU	C	56,4	1,5
AU_D	9	AU	D	28,0	1,4
SG_C	9	SG	C	50,5	1,9
SG_D	9	SG	D	22,8	0,7
AU_C	11	AU	C	65,7	2,3
AU_D	11	AU	D	17,4	1,4
SG_C	11	SG	C	63,9	2,5
SG_D	11	SG	D	17,4	1,4
AU_C	18	AU	C	71,5	1,5
AU_D	18	AU	D	11,1	1,6
SG_C	18	SG	C	58,3	3,9
SG_D	18	SG	D	8,8	0,5
AU_C	22	AU	C	71,0	1,6
AU_D	22	AU	D	10,2	1,9
SG_C	22	SG	C	57,2	3,1
SG_D	22	SG	D	8,4	0,6



Slika 12: SWC vrednosti, prikazane s povprečji in standardnimi napakami (N=8).
Figure 12: SWC values, displayed with averages and standard errors (N=8).

4.3 VIZUALNI IZGLED RASTLIN IN MORFOLOŠKI PARAMETRI

Rastline so bile med potekom poskusa zdrave in vitalne (slika 13 in 14). Pri suši izpostavljenih rastlinah sorte SG smo opazili venenje na 9 DSS, pri rastlinah sorte AU pa na 11 DSS. Največja razlika med sortama je bila pri rumenjenju listov rastlin v sušnem stresu. Šele zadnji dan vzorčenja (22 DSS) smo pri sorti AU opazili, da so spodnji rumeno - rjavi listi pričeli odpadati. Po drugi strani pa so listi sorte SG barvno rumeneli veliko prej kot pri sorti AU, praktično po tednu dni od izpostavljenosti sušnim razmeram. V času vzorčenja pri sorti SG v sušnih obravnavanjih, skoraj nismo imeli rumenih listov, saj so le - ti sproti odpadali. Na 22 DSS so bili tako pri sorti SG vsi preostali listi na rastlinah sušnih rastlin še zeleni, pri sorti AU pa so bili sami rumeni listi. Vendar so isti dan vzorčenja (22 DSS) imele rastline sorte AU še vse liste, medtem ko so bile rastline sorte SG že do polovice brez listov. Zaradi večje izgube listov pri rastlinah sorte SG, so rastline te sorte izgledale veliko bolj prizadete od sušnega stresa, kot rastline sorte AU (glej tudi slike 13 in 14). Rastline obeh sort so pričele različno kazati znake venenja in časovno različno se je kazalo tudi staranje listov, ti znaki so se pri sorti SG pričeli na 9 DSS, kar je dva dni prej kot pri rastlinah sorte AU. Največja razlika med sortama se je pokazala v različnem času pričetka odpadanja listov suši

izpostavljenih rastlin, saj so pri SG začeli odpadati že na 11 DSS, medtem ko so prvi listi pri AU odpadli šele pri 18 DSS, torej teden dni kasneje.



Slika 13: Rastlina hmelja izpostavljena sušnemu stresu (levo) in v kontrolnih razmerah (desno), sorta Aurora; 11 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu.

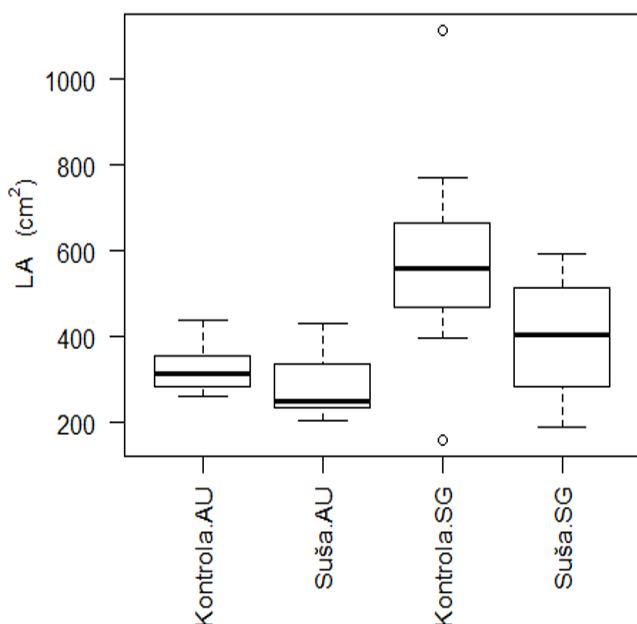
Figure 13: Hop plant exposed to drought stress (left) and in control conditions (right), cultivar Aurora; 11 days after drought stress treatment.



Slika 14: Rastlina hmelja izpostavljena sušnemu stresu (levo) in kontrolnih razmerah (desno), sorta Savinjski golding; 11 dni po izpostavljenosti sušnemu stresu.

Figure 14: Hop plant exposed to drought stress (left) and in control conditions (right), cultivar Savinjski golding, 11 days after drought stress treatment.

Celotna listna površina lista (LA) je bila analizirana le pri rastlinah, ki so bile uporabljeni v nadaljnji proteomske analizi. LA je morfološka lastnost, ki lahko pokaže različen odziv rastlin na sušni stres (slika 15). Pri kontrolnih rastlinah za sorto AU je bila povprečna vrednost LA 360 cm^2 s 95 % intervalom zaupanja med 290 in 430 cm^2 . Povprečna vrednost LA za kontrolne rastline pri sorti SG je bila za 186 cm^2 večja kot pri sorti AU, torej 546 cm^2 , 95 % interval zaupanja za to razliko je $107 - 266 \text{ cm}^2$ ($p=0,0000$). V povprečju je bila pri rastlinah obeh sort listna površina za 108 cm^2 manjša v sušnih razmerah v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (95 % interval zaupanja je 28 do 187 cm^2 , $p=0,009$), kar znaša pri AU 30 % manj in pri SG 19,7 % povprečne listne površine.



Slika 15: Listna površina (LA) za sorte Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Podatki so prikazani z okvirji z ročaji.

Figure 15: Leaf area (LA) for cultivars cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The data are presented using box plot.

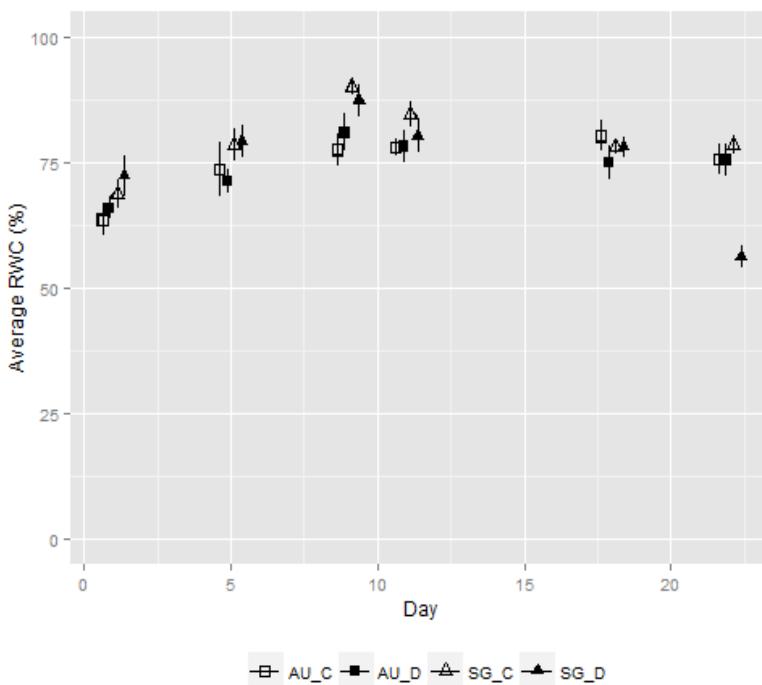
4.4 REZULTATI MERITEV FIZIOLOŠKIH PARAMETROV

Vrednosti RWC (relativne vsebnosti vode) v listih kontrolnih rastlin so se med poskusom gibale med 63,5 in 89,9 % (slika 16). V nasprotju s pričakovanji je bil učinek sušnega stresa na RWC v listih minimalen, saj smo večji padec RWC v listih rastlin v sušnih pogojih zabeležili šele proti koncu poskusa, 22 DSS. V 22 DSS je RWC pri suši izpostavljenih rastlinah sorte SG v primerjavi s kontrolnimi padel za 22,2 % ($p=0,0000$), medtem ko pri sorti AU ni bilo statistično značilnih razlik v RWC različno zalivanih rastlin. Vzporedne

meritve vodnega potenciala (Ψ) so pokazale podobno. Ko so bile SWC vrednosti visoke (60 - 70 vol. %), je bil Ψ v listih med 0,16 in 0,19 MPa, ko pa so vrednosti SWC padle na približno 10 vol. %, so vrednosti Ψ bile povprečno -0,23 MPa pri obeh sortah.

Preglednica 17: Relativna vsebnost vode (RWC) v listih hmelja. N = 8, sd = standardna deviacija.
Table 17: Relative water content (RWC) in leaves of hop. N = 8, sd = standard deviation.

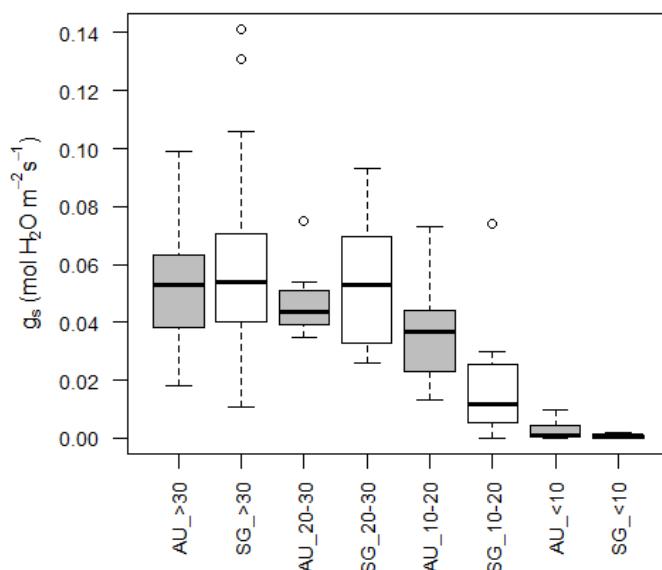
Obravnavanje	Dan	Sorta	Kontrola/ Suša	Povprečna vrednost RWC (%)	sd
AU_C	1	AU	C	63,5	3,2
AU_D	1	AU	D	65,8	2,2
SG_C	1	SG	C	68,6	2,7
SG_D	1	SG	D	72,1	4,2
AU_C	5	AU	C	73,6	5,4
AU_D	5	AU	D	71,2	2,4
SG_C	5	SG	C	78,4	3,1
SG_D	5	SG	D	79,1	3,0
AU_C	9	AU	C	77,5	3,1
AU_D	9	AU	D	80,8	3,7
SG_C	9	SG	C	89,9	1,7
SG_D	9	SG	D	87,3	3,2
AU_C	11	AU	C	77,9	1,7
AU_D	11	AU	D	78,1	3,3
SG_C	11	SG	C	84,5	2,6
SG_D	11	SG	D	80,1	3,3
AU_C	18	AU	C	80,1	3,0
AU_D	18	AU	D	74,9	3,5
SG_C	18	SG	C	78,0	1,5
SG_D	18	SG	D	77,9	2,0
AU_C	22	AU	C	75,5	3,0
AU_D	22	AU	D	75,4	3,2
SG_C	22	SG	C	78,3	1,8
SG_D	22	SG	D	56,2	2,3



Slika 16: RWC vrednosti prikazane s povprečji in standardnimi napakami (N=8).
Figure 16: RWC values, displayed with averages and standard errors (N=8).

Primerjava nadaljnjih fizioloških parametrov, je pokazala da so rezultati veliko bolj povedni, če namesto po dnevih (kot smo sicer vzorčili) rezultate podamo glede na SWC razrede. SWC vrednosti smo razdelili v 4 razrede, v 1. razredu so bile vrednosti SWC večje od 30 vol. % (le-te smo uporabili kot optimalno zelite rastline oziroma kontrolne rastline). V ostale skupine pa smo razdelili rastline v različnih stopnjah sušnega stresa in sicer SWC med 20-30 vol. %, med 10-20 vol. % ter tiste, kjer je bil SWC manj kot 10 vol. %. Statistična analiza ni pokazala enakih varianc med obravnavanji, zato so bili uporabljeni linearni modeli z neenakimi variancami, da smo lahko analizirali vpliv fizioloških parametrov na sorte in ter na SWC razrede.

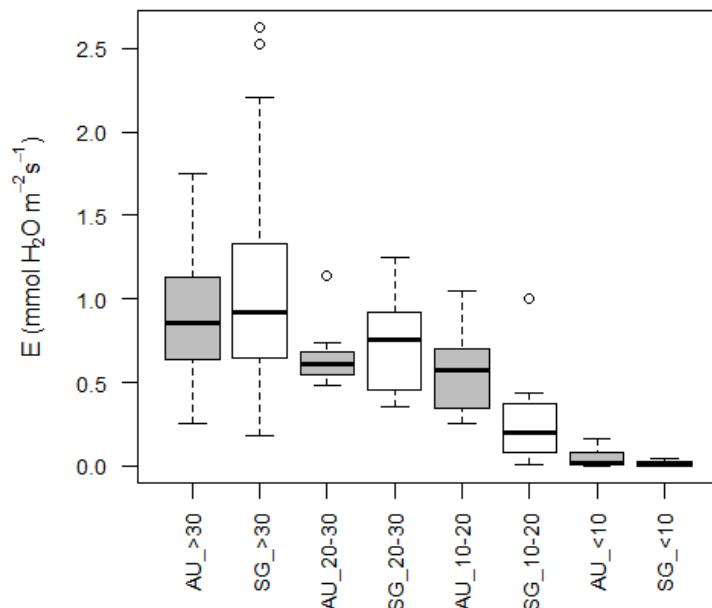
Meritve stomatalne prevodnosti (g_s) niso pokazale statistično značilne interakcije med sortama, niti ni bilo statistično značilnih učinkov sorte na g_s ($p=0,27$). Po drugi strani je učinek SWC na g_s statistično značilen ($p=0,0001$). Rastline so vzdrževale visoko stomatalno prevodnost v blažjem sušnem stresu (SWC 20-30 vol. %). S padcem SWC vrednosti na 10-20 vol %, je bila povprečna stomatalna prevodnost $0,031 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ z intervalom zaupanja (IZ) (0,020-0,042) pri rastlinah obeh sort (glej tudi preglednico 18). Zelo intenzivno zmanjšanje stomatalne prevodnosti ($0,0003 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) oziroma kar popolnoma zaprte listne reže pa smo določili, ko je SWC vrednost padla pod 10 vol. %.



Slika17: Stomatalna prevodnost (g_s) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

Figure 17: Stomatal conductivity (g_s) of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %).The data are presented using box plot.

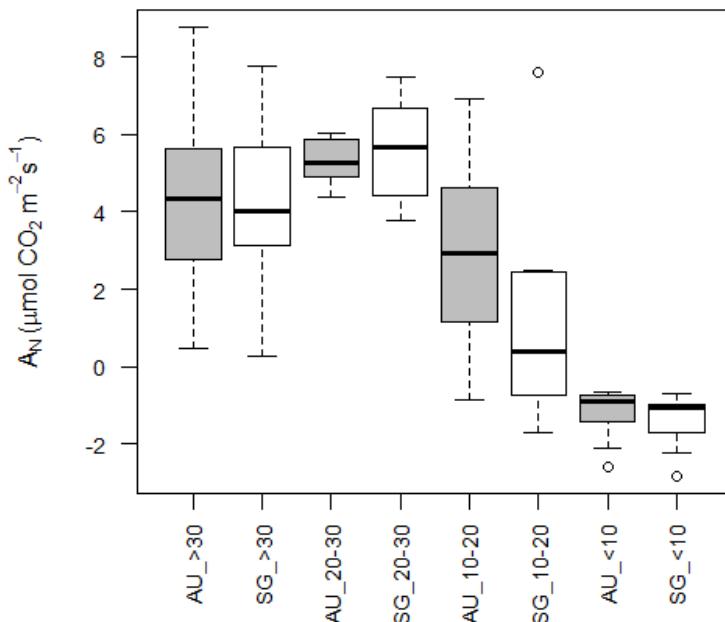
Zaprtje listnih rež ima za posledico zmanjšanje transpiracije (E). Podatki kažejo statistično značilne razlike že ko je SWC vrednost padla na 20-30 vol. %, glede na SWC > 30 vol. %. Povprečna E (0,658 mol H₂O m⁻² s⁻¹; z IZ 0,572-0,799) pri SWC vrednosti 10-20 vol. % ni statistično značilna od vrednosti E (0,512 mol H₂O m⁻² s⁻¹; z IZ 0,363-0,663) pri SWC 20-30 vol. %. Povprečna E pri SWC < 10 vol. % je statistično značilno nižja od drugih (0,015 mol H₂O m⁻² s⁻¹; z IZ 0,005-0,025), kar pomeni da transpiracija zaradi zaprtih listnih rež pri SWC < 10 vol. % praktično ne poteka več (slika 18, preglednica 18). Prav tako kot za g_s , tudi meritve E niso pokazale statistično značilne interakcije med sortama, prav tako ni bilo statistično značilnih učinkov sorte na E ($p=0,27$).



Slika18: Transpiracija (E) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

Figure 18: Transpiration (E) of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). The data are presented using box plot.

Povprečna fotosinteza (A_n) obeh sort pri SWC > 30 vol. % je bila $4,30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ z 95% IZ (3,97-4,64) in je bila statistično značilno manjša kot povprečna vrednost A_n pri SWC 20-30 vol. %; $5,35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (z IZ 5,00-5,35) (Slika 19). Velik padec A_n je bilo zaznati pri SWC vrednosti 10-20 vol. % ($2,02 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (z IZ 0,85-3,18)). Dihanje je preseglo fotosintezo (slika 19, preglednica 18) z naraščajočim sušnim stresom, SWC vrednosti pa so padle pod 10 vol. %. Prav tako kot za g_s in E tudi meritve A_n niso pokazale statistično značilne interakcije med sortama, prav tako ni bilo statistično značilnih učinkov sorte na A_n ($p=0,67$).



Slika19: Neto fotosinteza (A_N) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

Figure 19: Net photosynthesis (A_N) of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). The data are presented using box plot.

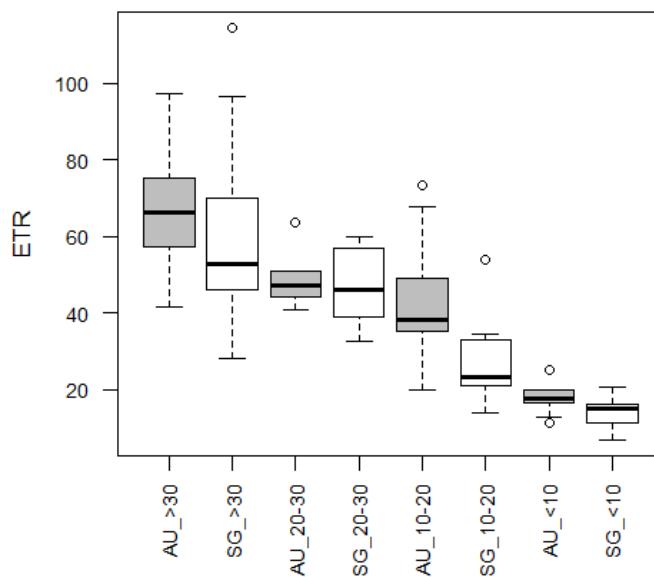
Preglednica 18: Povprečne vrednosti za g_s , E in A_n s 95 % intervalom zaupanja (IZ) za vsak SWC razred posebej (za obe sorte skupaj).

Table 18: Average values for g_s , E in A_n with 95 % confidence intervals (CI) for each SWC class separately.

SWC (vol. %)			g_s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)		E (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)		A_n (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	
	n (AU)	n (SG)	povprečje	95% IZ	povprečje	95% IZ	povprečje	95% IZ
več kot 30%	62	62	0.0530a	(0.049, 0.057)	0.931a	(0.854, 1.009)	4.30b	(3.97, 4.64)
20-30%	8	8	0.0486a	(0.041, 0.056)	0.685b	(0.572, 0.799)	5.35a	(5.00, 5.35)
10-20%	11	10	0.0311b	(0.020, 0.042)	0.512b	(0.363, 0.663)	2.02c	(0.85, 3.18)
manj kot 10%	9	13	0.0003c	(0.0002, 0.0011)	0.015c	(0.005, 0.025)	-1.33d	(-1.59, -1.06)

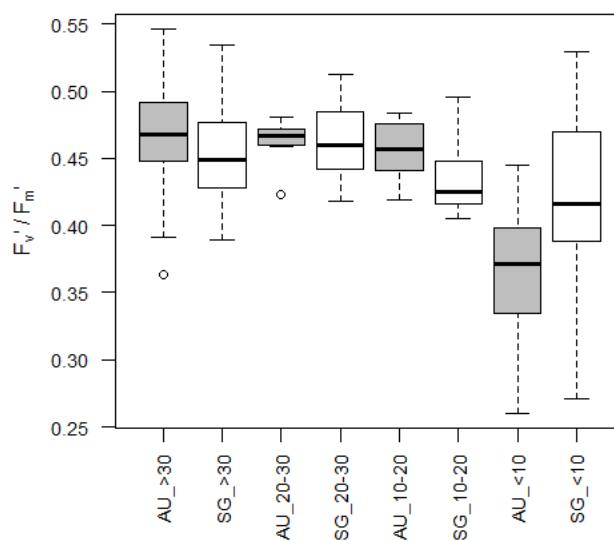
Statistično značilna razlika je pri $\alpha=0.05$ med povprečji, ki imajo dodano različno črko (a, b, c, d) v isti koloni tabele. Ker ni statistično značilne razlike med sortama pri nobenem parametru, so povprečja podana za obe sorte skupaj.

Hitrost toka elektronov (ETR) je pri stresiranih rastlinah z napredovanjem suše upadala. Vendar statistično značilnih razlik med sortama nismo potrdili, kar pa se kaže tudi na sliki 20.



Slika 20: Hitrost toka elektronov (ETR) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

Figure 20: Electron transport rate (ETR) of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %).The data are presented using box plot.

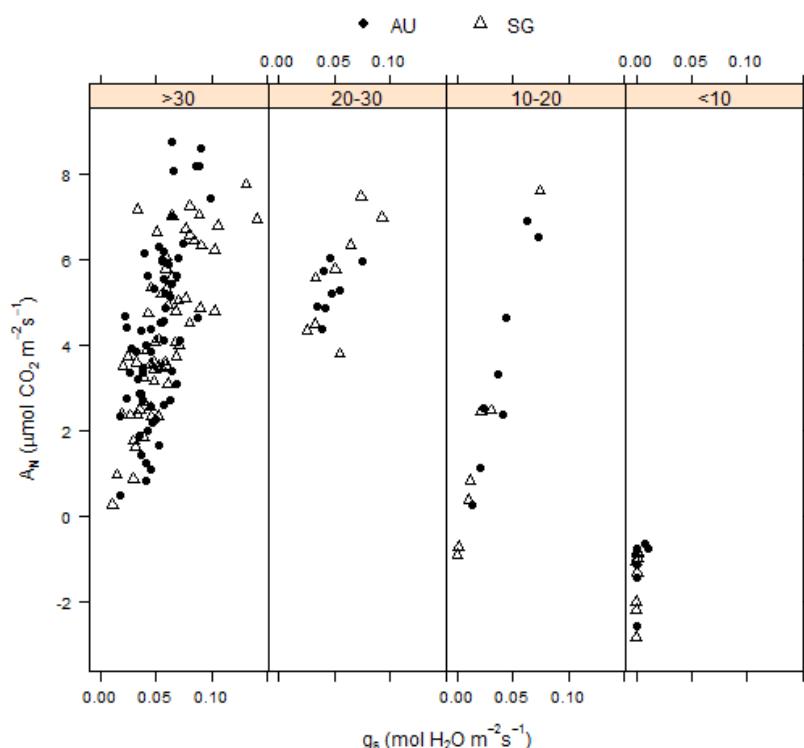


Slika 21: Fotokemična učikovitost (yield; F_v'/F_m') kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

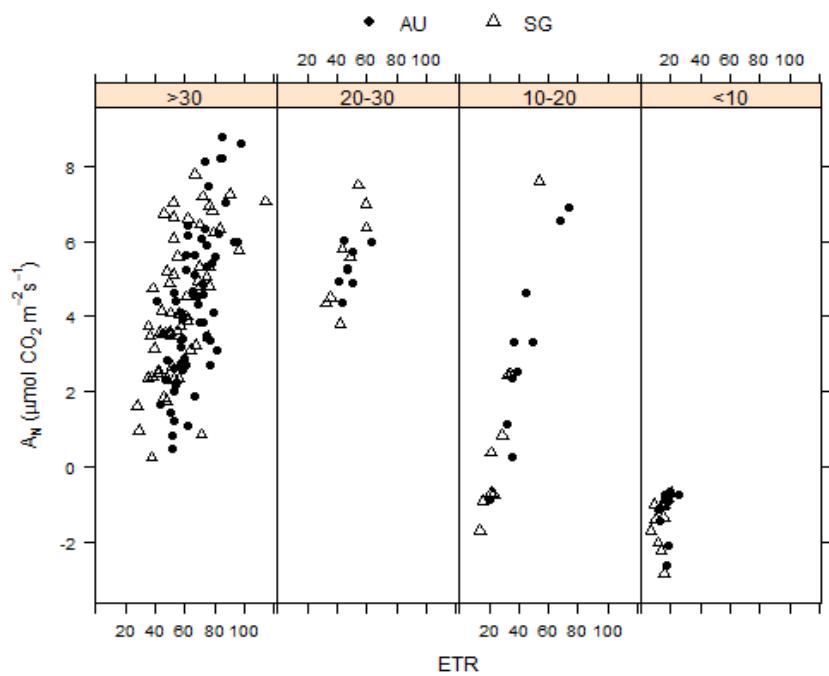
Figure 21: Photochemical efficiency (yield; F_v'/F_m') of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %).The data are presented using box plot.

Fotokemična učinkovitost (yield; Fv'/Fm') se je tekom poskusa ohranjala nad 0,40 tako pri kontrolnih rastlinah kot tudi pri suši izpostavljenih rastlinah. Ko so bile SWC vrednosti pod 10 vol. % so vrednosti Fv'/Fm' padle, sicer pri sorti AU bolj kot pri sorti SG (slika 21).

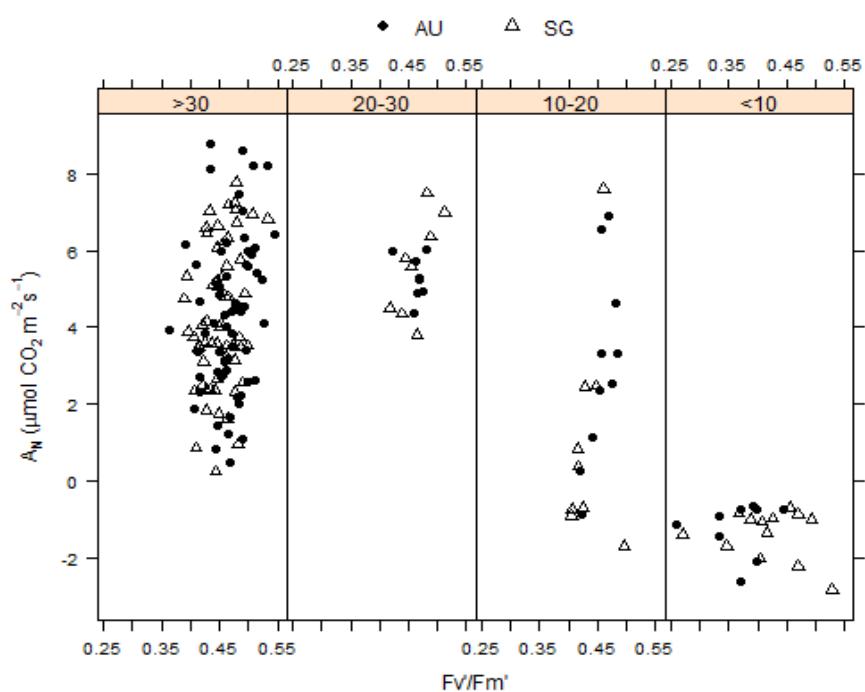
Linearni model smo uporabili za testiranje odvisnosti A_n od g_s , Fv'/Fm' in ETR glede na SWC razrede (glej tudi slike 22, 23 in 24). Rezultati so pokazali, da je A_n odvisna od SWC razredov, g_s ter njune interakcije. Po drugi strani smo ugotovili, da Fv'/Fm' in ETR nimata statistično značilnega vpliva na A_n (glej tudi slike 23 in 24). Zmanjšanje SWC povzroči zmanjšano A_n , poleg tega zmanjšanje SWC vpliva tudi na linearno odvisnost A_n na g_s , saj je pri nižjih SWC vrednostih linearne krivulje veliko bolj strme. Vpliv ETR na A_n ni odvisen od SWC razredov, saj višje ETR ter g_s vrednosti kažejo kot posledico tudi višje A_n vrednosti.



Slika 22: Graf odvisnosti A_n od g_s
Figure 22: Graph of dependence A_n on g_s .

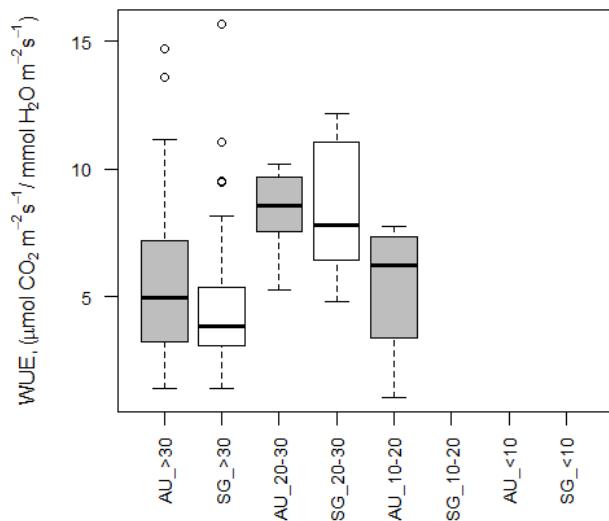


Slika 23: Graf odvisnosti A_n od ETR.
Figure 23: Graph of dependence A_n on ETR.



Slika 24: Graf odvisnosti A_n od F_v / F_m .
Figure 24: Graph of dependence A_n on F_v / F_m .

Pri vseh že omenjenih fizioloških parametrih statistično značilne razlike med sortama ni bilo, opazili smo razliko med sortama pri parametru učinkovitosti izrabljanja vode (ang. water use efficiency, WUE), vendar so razlike še vedno majhne. Najbolj očitna je bila razlika, ko je SWC vrednost padla na 10-20 vol. %, kjer so rastline sorte AU še vedno dosegale vrednosti $3,74 \pm 1,72 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, medtem ko so rastline sorte SG tako zmanjšale delovanje fotosinteze, da je bilo zaznati le dihanje. Pri še nižjih SWC vrednostih ($\text{SWC} < 10$ - 0 vol. %), je dihanje preseglo fotosintezo pri obeh sortah, kar pomeni, da izračun parametra WUE ni bil več smiseln (slika 25).



Slika 25: Učinkovitost izrabe vode (WUE) kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin hmelja sort Aurora (AU) in Savinjski golding (SG). Raven razpoložljive vode odražajo razredi SWC (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %). Podatki so prikazani v obliki okvirja z ročaji.

Figure 25: Water use efficiency (WUE) of control and drought stress of hop plants cultivars Aurora (AU) and Savinjski golding (SG). The level of available water is reflected in the SWC classes (> 30 %, 20-30 %, 10-20 % in < 10 %).The data are presented using box plot.

4.5 PROTEOMSKA ANALIZA LISTOV HMELJA V SUŠNEM STRESU

Za pridobitev čim boljšega vpogleda v odgovor rastlin hmelja na sušni stres, smo liste suši izpostavljenih ter kontrolnih rastlin obeh sort vključili v proteomsko analizo. Pri vzorčenju smo zbrali vse liste posameznih rastlin jih nato reprezentativno naprej analizirali. Analiza je bila narejena na 4 rastlinah pri vsakem obravnavanju, in sicer 11, 18 ter 22 DSS. Ti dnevi vzorčenja so bili izbrani, ker so takrat fiziološke meritve pokazale največjo razliko med suši izpostavljenimi ter kontrolnimi rastlinami. Sušnemu stresu smo določili stopnjo glede na dan vzorčenja po začetku poskusa ter pripadajočo SWC vrednost substrata pri suši izpostavljenih rastlinah, preglednica 19.

Preglednica 19: Stopnja stresa glede na dan vzorčenja rastlin ter SWC vrednost za rastline hmelja, vključene v proteomsko analizo.

Table 19: Drought stress level according to the day of sampling and SWC value for hop plants, included in proteome analysis.

Dan vzorčenja (DSS)	SWC vrednosti	Stopnja sušnega stresa
11	13-26 vol. %	Blagi sušni stres
18	7-13 vol. %	Zmerni sušni stres
22	5-12 vol. %	Močan sušni stres

Meritve koncentracije proteinov v vzorcih po ekstrakciji proteinov so navedene v preglednici 20.

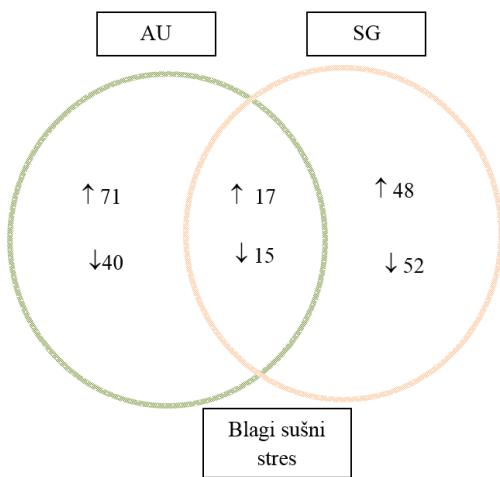
Preglednica 20: Koncentracije proteinov v vzorcih listov hmelja po ekstrakciji proteinov.

Table 20: Concentrations of proteins in hop after protein extraction.

Vzorec	Koncentracija proteinov (ng/µl)	Vzorec	Koncentracija proteinov (ng/µl)
K-SG-169	6,80	K-SG-98	9,62
K-AU-113	7,08	S-SG-88	4,34
S-AU-166	8,05	S-AU-19	6,15
K-SG-66	5,16	S-SG-25	5,79
S-AU-33	6,58	S-SG-15	3,72
S-SG-131	3,74	K-AU-4	8,58
K-AU-176	6,93	K-AU-133	8,24
K-SG-118	3,98	K-SG-61	4,90
S-AU-160	9,12	K-SG-75	4,73
S-AU-111	3,65	S-SG-198	5,14
S-SG-54	2,30	K-AU-103	5,75
K-SG-116	2,65	S-AU-165	1,56
K-SG-204	3,88	K-AU-189	5,65
S-SG-96	6,04	S-AU-52	1,18
S-SG-86	4,41	S-SG-64	1,95
K-SG-4	3,45	K-SG-108	3,17
K-AU-48	8,66	K-SG-112	6,51
S-SG-44	3,66	S-SG-20	2,68
S-AU-38	6,84	K-SG-181	5,34
K-AU-26	8,86	S-AU-135	1,34
S-AU-130	10,88	S-AU-1	2,98
K-AU-114	7,53	K-SG-151	2,80
S-SG-133	1,19	S-AU-96	2,58
S-AU-126	2,44	K-AU-81	6,39
S-AU-28	1,55	K-AU-179	4,08

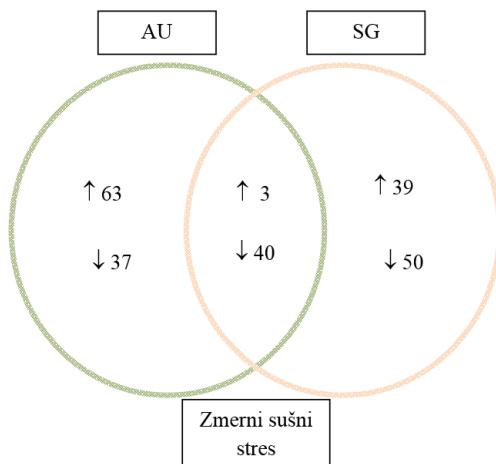
Spremembe v proteomu lista hmelja v treh različnih stopnjah sušnega stresa smo primerjali z metodo 2D-DIGE. S programom DeCyder določili 3664 proteinskih lis, od katerih je bilo 534 prisotnih na večini gelov (80 % gelov). Enosmerna ANOVA je pokazala 132 statistično značilnih sprememb v proteinskih lisah pri sorti SG in 143 pri sorti AU. S povprečnim

razmerjem proteinskih lis v rastlinah, izpostavljenih sušnemu stresu v primerjavi s kontrolnimi rastlinami smo določili pri sorti AU 88 proteinskih lis s povečano vsebnostjo in 55 z zmanjšano vsebnostjo v blagem sušnem stresu. Pri sorti SG smo v primeru blagega sušnega stresa določili 65 proteinskih lis s povečano vsebnostjo ter 67 z zmanjšano vsebnostjo (slika 26). Pri zmernem sušnem stresu smo pri sorti AU določili 66 proteinskih lis s povečano vsebnostjo ter 77 z zmanjšano vsebnostjo ter pri sorti SG 42 proteinskih lis s povečano vsebnostjo ter 90 z zmanjšano vsebnostjo proteinskih lis v suši izpostavljenih rastlinah glede na kontrolne rastline (glej tudi sliko 27). Pri močnem sušnem stresu je večina proteinskih lis odražala zmanjšano vsebnost proteinov glede na kontrolne rastline (81 pri sorti AU in 112 pri sorti SG), nekaj proteinskih lis pa je bilo določeno tudi s povečano vsebnostjo (62 pri sorti AU in 20 pri sorti SG) (slika 28). Z analizo dvosmerne ANOVE smo določili 83 proteinskih lis pri sorti AU in 27 pri sorti SG, katerih vsebnost se spreminja glede na sušni stres. Določili smo tudi 98 proteinskih lis pri sorti AU in 156 proteinskih lis pri sorti SG, katerih vsebnost se spreminja glede na dneve vzorčenja. Določili smo 21 proteinskih lis pri sorti AU in 8 v sorti SG, katerih vsebnost je spremenjena zaradi interakcije dejavnika sušnega stresa ter dni (DSS) vzorčenja ($p < 0,01$).



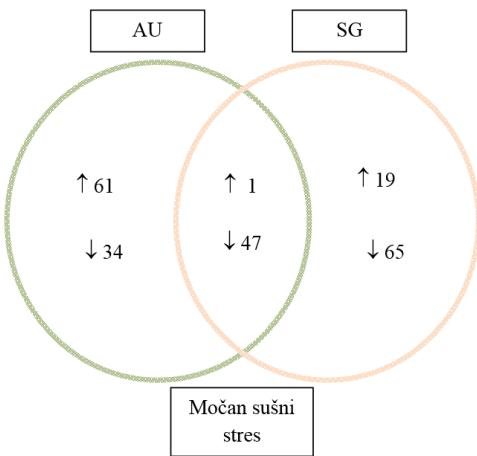
Slika 26: Venov diagram pri blagem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVO, $p < 0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno.

Figure 26: Venn diagram for mild drought stress showing the number of differentially expressed proteins (the fold change was calculated for proteins with one-way ANOVA $p < 0,01$). A protein increased in abundance if fold change values were positive and protein decreased in abundance if fold change values were negative.



Slika 27: Venov diagram pri zmernem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVA, $p<0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno.

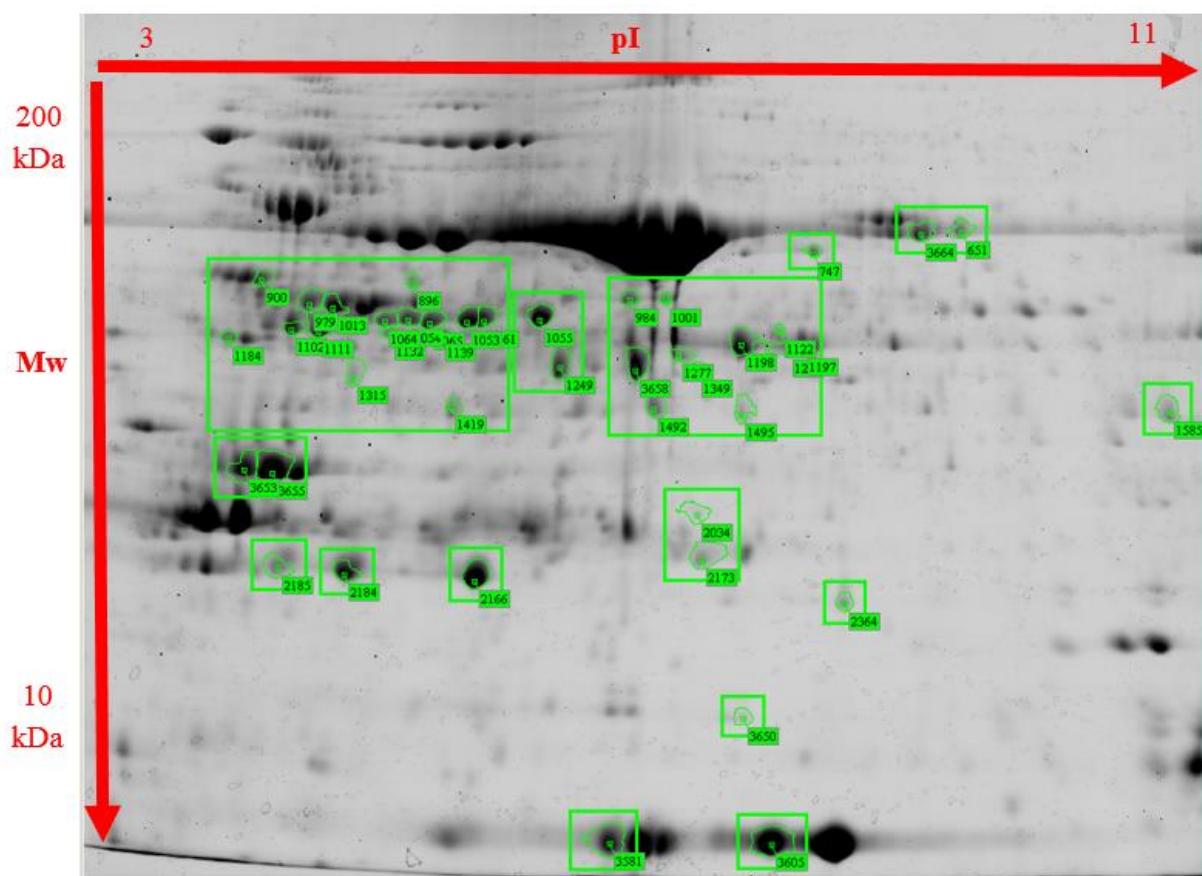
Figure 27: Venn diagram for moderate drought stress showing the number of differentially expressed proteins, the fold change was calculated for proteins with one-way ANOVA ($p<0,01$). A protein increased in abundance if fold change values were positive and protein decreased in abundance if fold change values were negative.



Slika 28: Venov diagram pri močnem sušnem stresu s prikazom proteinskih lis z različno vsebnostjo (sprememba je izračunana za proteinske lise z enosmerno ANOVA, $p<0,01$). Proteinska lisa s povečano vsebnostjo je tista, ki ima pozitivno vrednost in obratno.

Figure 28: Venn diagram for severe drought stress showing the number of differentially expressed proteins (the fold change was calculated for proteins with one-way ANOVA $p<0,01$). A protein increased in abundance if fold change values were positive and protein decreased in abundance if fold change values were negative.

V nadaljnji raziskavi smo glede na prikazano statistiko 44 proteinskih lis s spremenjeno vsebnostjo analizirali z masno spektrometrijo (MS). Za vseh 44 proteinskih lis je dvosmerna ANOVA pokazala statistično značilno spremembo glede na čas in/ali sušne pogoje. Izmed 44 proteinskih lis smo uspešno identificirali 28 proteinskih lis z uporabo baze podatkov MASCOT (preglednica 21). Izmed 28 identificiranih proteinskih lis smo 4 (številke proteinskih lis 1001, 900, 747, 2364) identificirali z uporabo programa BLASTP algoritma z EST sekvencami. Preostalih 16 proteinov nismo uspešno identificirali v bazi podatkov MASCOT, kljub temu, da kažejo zelo pomembno statistično značilno spremembo (bodisi povečano ali zmanjšano vsebnosti proteinske lise v sušnih pogojih). Neuspešno identifikacijo pripisujemo na splošno manjši vsebnosti teh proteinov v listih. Izmed 16 jih 5 ni imelo uspešno določenega masnega spektra, 11 pa jih ni bilo uspešno določenih, saj nismo našli nobene podobne sekvence v bazi podatkov MASCOT. Ena izmed neuspešno identificiranih proteinskih lis (proteinska lisa številka 2034) je izjemno zanimiva, saj se pri sorti AU proteinska lisa poveča v listih suši izpostavljenih rastlin, pri sorti SG pa zmanjša.



Slika 29: Preparativni gel z označenimi proteinskimi lisami, ki smo jih analizirani na MS.
Figure 29: Preparative gel with indicated proteins, which were included in MS analysis.

Preglednica 21: Identifikacija proteinov po analizi MALDI TOF/TOF v dveh sortah hmelja.
Table 21: Protein identification after MALDI TOF/TOF in two hop cultivars.

Št. prot. liste ^a	Ime proteina	Vrsta	NCBI akcесиjska številka	1	2 ^c	3	pI*	Mw*
1249	fruktoza-bisfosfat aldolaza,	<i>Genlisea aurea</i>	gi 527207121	130	1	17	5,92	38282
3658	NAPOVEDANO: fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, hloroplastna	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	gi 470107959	278	2	16	6,86	43091
1585	Malat dehidrogenaza	<i>Morus notabilis</i>	gi 703141981	215	2	12	8,21	37408
1001	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, domnevna	<i>Ricinus communis</i>	DV123935 XP_002510706.1 ^b	69	1	6	9,16	25767
1197	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza A podenota	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 166702	182	3	12	7,00	37937
1198	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza A podenota	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 166702	216	3	12	7,00	37937
1061	kloroplastna fosfoglicerat kinaza 3	<i>Helianthus annuus</i>	gi 317373797	295	2	12	6,69	50284
1065	kloroplastna fosfoglicerat kinaza 3	<i>Helianthus annuus</i>	gi 317373797	201	2	12	6,69	50284
1064	Fosfoglicerat kinaza	<i>Morus notabilis</i>	gi 703092700	65	1	4	5,61	42729
1495	NAPOVEDANO: feredoksin--NADP reduktaza, izoencim, kloroplastni	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	gi 470102732	58	1	5	8,69	40713
3655	kloroplastni fotosintetski kompleks za oksidacijo vode, 33kDa prekurzor, podenota	<i>Morus nigra</i>	gi 152143640	244	2	20	5,48	28477
3653	kloroplastni fotosintetski kompleks za oksidacijo vode, 33kDa prekurzor, podenota	<i>Morus nigra</i>	gi 152143640	306	3	20	5,48	28477
2166	domnevni PSII-P protein	<i>Trifolium pratense</i>	gi 84468376	221	2	16	7,12	28867
1111	NAPOVEDANO: fosforibulokinaza kloroplastna-podobna	<i>Cucumis melo</i>	gi 659130321	250	3	11	6,09	46855

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 21

Št. prot. lise ^a	Ime proteina	Vrsta	NCBI akcesijska številka	1	2 ^c	3	pI	Mw
1055	kloroplastna ribuloza-1,5- bisfosfat karboksilaza/oksi- genaza aktivaza mala podenota	<i>Acer rubrum</i>	gi 115334975	229	3	13	6,85	47909
1053	ribuloza-1,5- bisfosfat karbokslaza/oksig- enaza aktivaza	<i>Medicago truncatula</i>	gi 357492323	400	4	15	6,10	52536
900	RuBisCO aktivaza	<i>Hordeum vulgare</i>	CJ920232 BAF93200.1 ^b	78	1	28	4,99	7556
896	ribuloza-bisfosfat karboksilaza aktivaza	<i>Common tobacco</i>	gi 100380	126	1	15	5,01	26084
1054	RuBisCO aktivaza; prekurzor	<i>Cucumis sativus</i>	gi 266893	198	2	10	7,57	45909
3605	RuBisCO mala odenota; prekurzor	<i>Pinus thunbergii</i>	gi 132150	83	1	8	8,80	19585
1132	glutamin sintetaza 1	<i>Brassica napus</i>	gi 440808133	102	1	10	5,92	28339
1139	glutamin sintetaza	<i>Saccharum officinarum</i>	gi 56681317	72	1	4	5,28	40470
1013	glutamin sintetaza	<i>Canavalia lineata</i>	gi 6578120	85	1	7	6,28	47670
747	Alanin aminotransferaza 2	<i>Aegilops tauschii</i>	BJ482160 EMT29455.1 ^b	64	1	8	4,91	23982
1419	laktoilglutation liaza	<i>Gossypium hirsutum</i>	gi 211906514	62	1	4	5,69	32609
2364	Pričakovano: avksin-vezavni protein ABP19a- like	<i>Eucalyptus grandis</i>	EX519103 XP_010049430.1 ^b	153	1	12	8,88	33674
1234	domnevni RNA vezavni protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 3850621	58	1	4	7,71	42303
651	serin hidroksimetiltran sferaza 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 30690394	132	1	6	8,81	57476

^a - Številka proteinske lise, ki ustreza številki na "master" gelu.^b - Akcesijska številka z baze podatkov NCBI , ki je prevedena iz EST sekvence.^c - Statistično značilna p vrednost manj kot 0,01.

1 - Ocena vseh ujemajočih peptidov.

2 - Število ujemajočih peptidov.

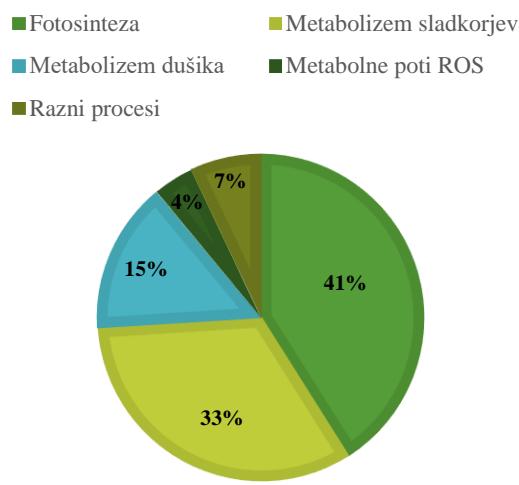
3 - % ujemanje zaporedja.

pI*- teoretična pI

Mw*- teoretična Mw

4.6 DOLOČITEV FUNKCIJE IDENTIFICIRANIH PROTEINSKIH LIS

Vseh 28 identificiranih proteinskih lis smo na podlagi biološke funkcije proteinov v rastlinah uspešno umestili v 5 večjih funkcionalnih skupin. Največ proteinov je bilo umeščenih v metabolizem sladkorjev in v proces fotosinteze, medtem ko so bili ostali uvrščeni v metabolizem dušika in med proteine, vključene v metabolne poti ROS. Tri proteine smo uvrstili med razne procese, saj jih je bilo težko povezati v skupino procesov (preglednica 21 in slika 30). Med vsemi identificiranimi proteini jih je bilo 9 vključenih v metabolizem sladkorjev (vsi z zmanjšano vsebnostjo ob močnejšem sušnem stresu v obeh sortah). Sušni stres je pri obeh sortah povzročil tudi zmanjšano vsebnost 11 vključenih v proces fotosinteze. Štirje proteini so bili uvrščeni v metabolizem dušika, 2 s povečano vsebnostjo ter 2 z zmanjšano vsebnostjo v sušnem stresu glede na kontrolne rastline. Ena protinska lisa s povečano vsebnostjo je bila uvrščena v metabolne poti ROS. Tri protinske lise so bile vključene v skupino raznih proteinov, ena s povečano vsebnostjo v sušnem stresu in dva z zmanjšano.



Slika 30: Tortni diagram s funkcionalno razporeditvijo identificiranih proteinov.
Figure 30: Pie chart including functional distribution of identified proteins.

Preglednica 22: Identificirani proteini v listih hmelja s statistično značilno spremenjeno vsebnostjo proteinskih lis.
Table 22: Identified proteins in hop leaves with statistically significant changed content in protein spots.

Št. Protein. lise ^a	Ime proteina	Akcesijska številka ^b in funkcija ^d	SG ^c BSS	SG ^c ZSS	SG ^c MSS	AU ^c BSS	AU ^c ZSS	AU ^c MSS
Matabolizem sladkorjev^d								
1249	fruktoza-bisfosfat aldolaza,	Q9ZU52 ^b	-1,03	-1,13	-2,64	-1,16	-1,13	-1,51
3658	NAPOVEDANO: fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, hloroplastna	Q9SJU4	1,05	-1,18	-2,42	-1,13	-1,14	-1,80
1585	malat dehidrogenaza	Q8IE66	-1,04	-1,07	-1,42	-1,28	-1,41	-2,29
1001	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, domnevna	Q8LSX0	-1,07	-1,95	-3,92	-1,07	-1,74	-2,25
1197	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza A podenota	Q8LSX0	1,13	-1,37	-1,75	1,07	-1,09	-1,07
1198	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza A podenota	Q8LSX0	1,01	-1,23	-1,79	1,04	-1,09	-1,02
1061	kloroplastna fosfoglicerat kinaza 3	Q9LD57	1,06	-1,46	-2,22	-1,19	-1,30	-2,56
1065	kloroplastna fosfoglicerat kinaza 3	Q9LD57	1,03	-1,33	-2,31	-1,29	-1,36	-2,52
1064	Fosfoglicerat kinaza	Q9LD57	-1,16	-1,32	-3,02	-1,54	-1,67	-3,51
Fotosinteza								
1495	NAPOVEDANO: feredoksin--NADP reduktaza, izoencim, kloroplastni	Q8W493	1,01	-1,49	-2,33	1,13	-1,07	-1,88
3655	kloroplastni OTOSINTETSKI kompleks za oksidacijo vode, 33kDa prekurzor, podenota	A7LCN2	-1,02	-1,82	-2,16	-1,20	-1,22	-2,29
3653	kloroplastni OTOSINTETSKI kompleks za oksidacijo vode, 33kDa prekurzor, podenota	A7LCN2	1,07	-1,85	-2,49	-1,41	-1,36	-2,05
2166	domnevni PSII-P protein	Q2PET1	-1,24	-1,87	-3,49	1,01	-1,05	-3,41
1111	NAPOVEDANO: fosforibulokinaza, kloroplastna-podobna	P09559	-1,25	-1,47	-2,87	-1,06	-1,12	-1,41

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 22

Št. Protein- lise ^a	Ime proteina	Akcesijska številka ^b in funkcija ^d	SG ^c BSS	SG ^c ZSS	SG ^c MSS	AU ^c BSS	AU ^c ZSS	AU ^c MSS
1055	kloroplastna ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza mala podenota	P93431	1,12	-1,44	-2,69	-1,18	-1,45	-3,41
1053	ribuloza-1,5-bisfosfat karbokslaza/oksigenaza aktivaza	P93431	1,01	-1,32	-2,65	-1,28	-1,51	-2,82
900	RuBisCO aktivaza	P10896	1,17	-1,39	-1,35	-1,45	-1,60	-1,49
896	ribuloza-bisfosfat karboksilaza aktivaza	P10896	1,02	-1,06	-1,59	-1,46	-1,49	-1,45
1054	RuBisCO aktivaza; prekurzor	P10896	-1,06	-1,40	-2,94	-1,33	-1,45	-2,42
3605	RuBisCO mala podenota; prekurzor	Q0INY7	1,14	-1,41	-1,72	1,52	-1,30	-2,61
Metabolizem dušika								
1132	glutamin sintetaza 1	P14654	-1,21	1,08	1,68	1,09	1,36	2,34
1139	glutamin sintetaza	P14654	1,01	1,13	1,46	1,18	1,42	3,00
1013	glutamin sintetaza	P14654	-1,06	-1,34	-3,03	-1,08	-1,43	-1,91
747	alanin aminotransferaza 2	Q9LDV4	1,07	-1,20	-1,72	1,05	-1,14	-1,86
Metabolne poti ROS								
1419	laktoilglutation liaza	Q9ZS21	1,28	2,16	1,62	1,63	1,45	1,38
Razni procesi								
2364	Pričakovano: auksin-vezavni protein ABP19a-like	P13689	1,07	1,20	1,26	1,85	1,97	3,26
1234	domnevni RNA vezavni protein	-	-1,02	-1,45	-2,73	-1,16	-1,25	-2,04
651	serin hidroksimetiltransferaza 2	Q9SZJ5 ^b	1,14	-1,29	-1,89	-1,14	-1,33	-1,47
Neidentificirani^e								
1102	-	-	-1,24	-1,57	-2,65	-1,25	-1,25	-1,40
1122	-	-	1,06	-1,50	-1,37	-1,17	-1,40	-1,43
1184	-	-	-1,19	-1,54	-2,50	-1,16	-1,61	-1,95
1277	-	-	-1,08	-1,20	-2,15	-1,06	-1,20	-1,74
1315	-	-	1,09	-1,26	-1,52	-1,39	-1,47	-2,09
1349	-	-	-1,16	-1,40	-1,19	1,00	-1,05	-1,76
1492	-	-	1,01	-1,49	-1,77	-1,11	-1,13	-1,64
2034	-	-	-1,13	-1,41	-2,17	1,21	1,48	2,16

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 22

Št. Protein. lise ^a	Ime proteina	Akcesijska številka ^b in funkcija ^d	SG ^c BSS	SG ^c ZSS	SG ^c MSS	AU ^c BSS	AU ^c ZSS	AU ^c MSS
2173	-	-	1,01	-1,04	-1,78	-1,03	-1,08	-1,34
2184	-	-	-1,33	-1,81	-2,94	-1,11	-1,08	-2,60
2185	-	-	-1,20	-1,78	-3,01	-1,04	-1,19	-2,30
3581	-	-	1,23	-1,01	-2,10	1,11	-1,67	-1,93
3650	-	-	-1,10	-1,57	-2,66	-1,04	-1,13	-2,20
3664	-	-	1,11	-1,03	-1,45	1,10	-1,32	-1,26

^a - Številka proteinske lise, ki ustreza številki na "master" gelu.

^b - Akcesijska številka v bazi podatkov UNIPROT pri identifikaciji proteinov.

^c - Povprečno razmerje velikosti proteinske lise v suši izpostavljenih rastlinah glede na kontrolne.

^d - Funkcija v rastlini.

^e - Tisti identificirani proteini, pri katerih nismo uspešno dobili MS spektra ali pa njegovi rezultati niso bili statistično značilni.

BSS - Blagi sušni stres pri rastlinah.

ZSS - Zmerni sušni stres pri rastlinah.

MSS - Močan sušni stres pri rastlinah.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen raziskave je bil pridobiti vpogled v odziv rastline hmelja na pomanjkanje vode ter pri tem ovrednotiti morebitne razlike med dvema sortama (AU in SG). V ta namen smo spremljali več fizioloških parametrov stresiranih in nestresiranih rastlin ter opravili proteomsko analizo listov hmelja.

Pred izvedbo glavnega poskusa smo leto prej (v letu 2013) izvedli preliminarni poskus, ki je bil izveden na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v letu 2013 in je bil enako zastavljen kot kasnejši poskus, ki smo ga uporabili za nadaljnje proteomske analize. V preliminarnem poskusu smo vzgojili rastlinski material (poglavlje 3.3, le da nismo opravili presaditve v večje lonce), tako pridobljene rastline smo smiselno tretirali v sušnih/kontrolnih razmerah (poglavlje 3.4, le da v preliminarnem poskusu nismo vključili podrobnejšo analizo substrata z retenzijsko krivuljo) ter opravili fiziološke meritve rastlin in substrata (glej poglavje 3.5). V preliminarnem poskusu smo naleteli na težave z neizenačenim rastlinskim materialom, kar je bil glavni razlog, da smo v poskusu dodali pedološke meritve substrata ter da smo z vzorčenjem pričeli, ko so bile rastline večje kot v preliminarnem poskusu. V preliminarnem poskusu so bile rastline sorte AU očitno manjše v primerjavi z rastlinami sorte SG. To je imelo posledično seveda velik vpliv pri njihovem odzivu na sušni stres. V preliminarnem poskusu smo vzorčenje in izpostavljenost sušnemu stresu izvedli poleti v neklimatiziranem rastlinjaku. Ob vročem in suhem vremenu je po vzpostavitvi suše, le ta hitro napredovala, poleg sušnega stresa pa so bile rastline prizadete zaradi vročinskega stresa. Glede na to smo glavni poskus izvedli proti koncu pomlad, določili meje, da najnižja temperatura ne sme pasti pod 5 °C, ter najvišja ne sme preseči 40 °C. V preliminarnem poskusu smo ugotovili, da manjši lonci (0,5 L) niso dovolj veliki za rast rastlin do velikosti, ki smo jo želeli uporabiti v raziskavi (razvitih 10 pravih listov). Ob vzorčenju smo namreč opazili, da so korenine zelo prepletene in da jim zmanjkuje prostora za rast. Glede na to smo pri ponovnem poskusu uporabili 1,4 L lonce, ki so koreninam zagotovili dovolj prostora za prosto in neomejeno rast. Sušni stres pri preliminarnem poskus smo izvedli tako, da smo polovico rastlin popolnoma prenehali zalivati, kar je ob velikih razlikah v velikosti AG in SG rastlin ter vročem in suhem vremenu pripeljalo do tega, da so rastline sorte AU veliko hitreje venele. Zato smo v glavnem poskusu vzpostavili večji nadzor nad vsebnostjo vode v substratu. Leto kasneje smo izvedli poskus, ki nam je omogočil bolj optimalno pridobljen rastlinski material za vzorčenje.

V raziskavah, kjer se proučuje vpliv sušnega stresa na rastline, moramo kar se da natančno opredeliti razpoložljivost vode za rastline in omejiti možne nekontrolirane učinke sušenja substrata na vodni status rastline. Precej objavljenih molekularnih raziskav sušnega stresa ne vključuje natančne opredelitve vodnega statusa substrata in rastline, kar pa je pomemben

podatek za lažjo oceno intenzivnosti sušnega stresa, pravilno interpretacijo rezultatov, pa tudi za ponovitev takšne raziskave (Jones, 2007). V našem poskusu smo - tudi na podlagi izkušenj iz preliminarnega poskusa - natančneje definirali režim zalivanja na podlagi pridobljenih rezultatov vodnoretenzijske krivulje substrata. Suši izpostavljenim rastlinam smo bolj kontrolirano postopno zmanjševali vsebnost vode v substratu, pri čemer smo rastlinam s preveč izsušenim substratom dolili vodo, tako da smo izenačili mase vseh loncev s substratom in rastlino znotraj istega obravnavanja, ter da smo se v vsaki točki približali tarčnim vrednostim SWC. Na takšen način smo SWC vrednosti znotraj obravnavanj kontrolo oz. suša čim bolj izenačili. Po drugi strani smo vrednosti RWC ter vodnega potenciala spremljali kot parametre, ki nam kažejo vodni status rastline. V poskusu je pomembno vzpostaviti tudi pravilno vzorčenje oz. opravljanje meritve na pravih delih rastline. Tu se pojavi vprašanje ali je bolje vzorčiti liste v zgornjem delu rastline, kjer se odziv na sušni stres zazna kasneje. Ena izmed možnosti je tudi vzorčenje vseh listov, kjer pa se je potrebno zavedati, da so prisotni tudi rumeni listi, ki so senescentni in lahko posledično zabrišejo realno stanje rastlini. Oba pristopa sta v literaturi že objavljena, ni pa še jasno kaj nas lahko pripelje do bolj uporabnih rezultatov. Glibert in Media (2016) sta že opisala nekaj različnih postopkov, kako postopati v postavitvi poskusa pri raziskovanju odziva na sušo. Vendar je v nujni razlogi predpogoj vsaj osnovno poznavanje mehanizma rastline. Sicer sta predлага štiri generalne mehanizme, kjer je osnova, da se upošteva intenzivnost in čas trajanja pomanjkanja vode pri tovrstnih raziskavah. Kljub vsemu pa vprašanje glede bolj optimalnega vzorčenja ostaja odprto.

Dosedanje raziskave odziva hmelja na sušni stres so tako potekale v lončnih poskusih s kontroliranimi razmerami (Gloser in sod., 2013; Korovetska in sod., 2014, 2015; Jupa in sod., 2016), izjema je raziskava Majerjeve (1997), ki je poleg lončnega poskusa vključevala tudi poskus v hmeljski žičnici. Poskus izveden v hmeljišču bi pokazal najbolj realne rezultate, vendar za potrebe tako izenačenega rastlinskega materiala kot smo ga potrebovali v našem poskusu, je poskus v žičnici nemogoče izvesti. Poljske meritve bi namreč bile veliko bolj variabilne, poleg tega pa bi za zadostno število ponovitev težko zagotovili primerljive razmere poskusa. Zaradi višine hmelja (7-9 m) ter njegove rasti v žičnicah, bi bilo delo takšnega poljskega poskusa zelo oteženo; praktično nemogoče oz. finančno zelo obremenjujoče je na obstoječo žično konstrukcijo postaviti streho za zagotavljanje sušnih razmer. Kontrolo nad SWC in drugimi dejavniki v okolju, ki vplivajo na stanje vode v rastlini, je veliko lažje izvajati v lončnem poskusu, zlasti pri hmelju, ki je trajnica z obsežnim koreninskim sistemom. To so razlogi, da smo izvedli lončni poskus, kjer je mogoče pri izvedbi kontrolirati več parametrov kot v naravnih razmerah. Z optimalnim tretiranjem poskusnih rastlin proti boleznim in škodljivcem smo preprečili kakršenkoli biotski stres, s spremeljanjem temperature in relativne vlage v rastlinjaku pa smo ugotovili, da rastline niso bile izpostavljene vročinskemu stresu. Ta spoznanja so namreč pomembna, saj tako lahko trdimo da v raziskavi pridobljeni rezultati kažejo odziv hmelja izključno na sušni stres.

5.1.1 Fiziološki odziv

Rezultati našega poskusa kažejo zelo stabilno vodno bilanco hmelja. Večji padec vrednosti RWC in vodnega potenciala smo lahko zabeležili šele pri močnem sušnem stresu (pri 22 DSS), ko so se SWC vrednosti gibale med 8,4 in 10,4 vol. %. Po drugi strani pa so v prejšnjih raziskavah ugotovili, da vrednosti vodnega potenciala močno padejo že pri SWC vrednosti $0,75 \text{ g g}^{-1}$ (Gloser in sod., 2013; Korovetska in sod., 2014). V raziskavi Gloser in sod. (2013) je opoldne vodni potencial lista pri sušnih rastlinah padel do vrednosti -2,34 MPa. V raziskavi Korovetske in sod. (2014) je bil pri SWC vrednostih $0,8$ do $1,4 \text{ g g}^{-1}$ vodni potencial hmelja 0 do -0,5 MPa, ko so se SWC vrednosti znižale na $0,5 \text{ g g}^{-1}$ je vodni potencial padel do vrednosti -1 MPa. Tako so Gloser in sod. (2013) na podlagi meritev dnevnih hodov vodnega potenciala hmelj uvrstili med anizohidre rastline, medtem ko naši rezultati zaradi majhnih sprememb v vodnem potencialu ter RWC vrednosti ob sušenju substrata nakazujejo izohidro vodno bilanco. Eden od možnih razlogov za razhajanje med rezultati obeh raziskav je, da smo v našem poskusu merili tako RWC kot vodni potencial v zgornjem delu rastline, natančneje na 4. listu (izmed 10 pravih listov) od zgoraj navzdol. V tem delu rastline ohranjajo turgor in ostajajo v sušnih pogojih vitalne dlje časa, medtem ko so spodnji listi prej prizadeti in začnejo tudi veliko prej veneti. Takšen odziv rastlin v sušnih pogojih je znan iz drugih raziskav, saj omogoča rastlinam rast v blagih sušnih pogojih (Zhao in sod., 2015). Razlike v rasti med sortama so bile določene z merjenjem listne površine (LA). Celotna listna površina je bila večja pri sorti SG v primerjavi z AU. To je sortna lastnost, saj je LA na splošno pri sorti SG večji kot pri AU, kar je genotipsko pogojeno in ni posledica sušnega stresa. Zmanjšanje LA pri rastlinah, izpostavljenih sušnemu stresu, lahko pripisujemo senescenci ter izgubljanju starejših listov. Zmanjšana LA se je pri sorti SG pričela kazati nekaj dni prej kot pri AU. V naravnih pogojih bi pričakovali, da bi bili najbolj prizadeti listi zaradi sušnega stresa ravno tisti najvišje na rastlini, zaradi nezadostne preskrbe z vodo, ki jo povzroči poslabšanje hidravličnega sistema rastline. V hmeljiščih v sušnih letih (običajno v kombinaciji z vročinskim stresom) bistveno prej rumenijo spodnji listi pri SG, nekje do 2 metrov višine, medtem ko pri AU tega pojava ni opaziti (Čerenak, 2017).

Rastline so tekom evolucije razvile zapletene mehanizme za odzivanje na zmanjšano razpoložljivost vode. Ob sušnem stresu so morale vzpostaviti mehanizme za ponovno uravnavanje metabolizma in rasti kot odgovor na sušni stres. S fiziološkega, biokemijskega ter morfološkega vidika se lahko ta odziv razlikuje tudi na ravni sort (McDowell in sod., 2008; Claeys in Inze, 2013). To so npr. razlike v času zapiranja listnih rež, v globini koreninjenja, stopnji omejitve rasti, senescenci listov ter v dormanci. Kljub temu da smo med poskusom zabeležili kar nekaj razlik med vključenima sortama, predvsem v senescenci listov in smo jih zgoraj že opisali, pa nadaljnje natančnejše meritve to razliko le še nakazujejo, saj je teh razlik precej manj. V našem poskusu so rastline hmelja ob zmerinem stresu izboljšale učinkovitost izrabe vode (WUE) z zmanjšanjem stomatalne prevodnosti (g_s), ki je posledično omejila transpiracijo (E) brez večjih vplivov na potek fotosinteze. g_s se

je v hujšem sušnem stresu zmanjšala do te mere, da zaradi negativnih vrednosti neto fotosinteze vrednotenje WUE ni bilo več smiselno. Tomás in sod. (2014) menijo, da je preveč študij, ki se osredotočajo le na WUE v listu rastline. Za boljši vpogled bi bilo potrebno določiti tudi WUE celotne rastline (koliko vode rastlina porabi glede na to koliko biomase doda), kar predvidevamo da bo cilj v naših nadaljnjih raziskavah. Ko je suša v našem poskusu napredovala in so se SWC vrednosti še zmanjšale, je to vodilo do stomatalne inhibicije fotosinteze. Na neto fotosintezo (A_n) pa ni vplivalo le zapiranje rež, ampak tudi zmanjšanje fotokemične učinkovitosti, kar pomeni, da je sušni stres vplival tudi na procese na tilakoidi, kar nakazuje na ne – stomatalno inhibicijo fotosinteze.

Opazili smo razlike med sortama in sicer pri merjenju RWC, kjer je pri 22 DSS vrednost pri sorti SG izrazito padla, medtem ko je pri AU pravzaprav ostala nespremenjena. Rezultati ga nakazujejo, da so se listne reže pri sorti SG ob napredovanju suše zaprle prej kot pri sorti AU (SWC 10-20 vol. %). Posledično se pri tej SWC vrednosti (10-20 vol. %) pri sorti SG prej zmanjša tudi E v primerjavi s sorto AU. A_n se je prav tako veliko prej znižala pri sorti SG (SWC pri 10-20 vol. %) v primerjavi z AU, medtem ko so bile vrednost pri SWC < 10 vol. % pri obeh sortah izenačene. Podobno smo ugotovili tudi pri parametru WUE, kjer je sorta AU dlje vzdrževala visoke vrednosti WUE v primerjavi z SG. Vsi ti parametri samo nakazujejo da ima sušni stres večji vpliv na sorto SG v primerjavi s sorto AU, vendar te razlike niso statistično značilne. Podobno so pri češki raziskavi (Jupa in sod., 2013) ugotovili, da med njihovimi sortami Agnus, Osvaldov klon 31, Vital ni večjih razlik v hidravličnih lastnostih ksilema, ki imajo velik pomen za normalen transport vode v sušnih razmerah. Naš poskus je potekal v loncih in korenine so bile kljub zadostni velikosti lonca, omejene. Vizualno pa kljub temu v koreninski strukturi ni bilo očitnih razlik med sortama. Razlike med različno tolerantnimi sortami na sušo so sicer zelo znane pri drugih kmetijskih rastlinah, predvsem zaradi razlik v odzivnosti rež (Benešová in sod., 2012; Fenta in sod., 2012; Turyagyenda in sod., 2013).

5.1.2 Odziv na ravni proteoma

Identificirane proteine, katerih vsebnost je bila različna med rastlinami v sušnem stresu in kontrolnimi rastlinami, smo razvrstili v skupine glede na njihovo funkcijo. Razlike glede na čas trajanja poskusa z upoštevanjem vseh proteinskih lis, katerih vsebnost se je v sušnem stresu spremenila, so lepo razvidne v Venovih diagramih na slikah 26, 27, 28, kjer je z naraščajočo sušo vedno več proteinov z zmanjšano vsebnostjo in vedno več skupnih obema sortama. To nakazuje, da je večina skupnih proteinov z zmanjšano vsebnostjo pri obeh sortah del osnovnih fizioloških procesov, kot sta fotosinteza in energijski metabolizem. V naši raziskavi smo ugotovili, da se v obeh sortah kot splošen odziv na sušni stres pokaže zmanjšanje vsebnosti večine proteinov. Pri sorti AU je bilo ob močnem sušnem stresu kar 61 proteinov s povečano vsebnostjo in 34 proteinov z zmanjšano vsebnostjo, po drugi strani

pa je pri sorti SG rezultat nasproten, saj je kar 65 proteinov z zmanjšano vsebnostjo ter 19 s povečano. Ti rezultati nakazujejo na razlike med opazovanimi sortama, kar bi bilo vredno raziskati v nadaljnjih študijah, saj veliko teh, med sortama diferencialno izraženih lis nismo uspeli identificirati. Če upoštevamo le identificirane proteine, se kaže podoben odziv med obema sortama. Na takšne rezultate proteomske analize ima lahko vpliv tudi način vzorčenja, saj smo zbrali vse liste rastline ter jih uporabili kot en vzorec, s čimer smo žeeli dobiti proteinsko sliko rastline in ne posameznega lista, kot pa je bilo to narejeno pri fizioloških meritvah. Oba načina vzorčenja sta v literaturi že bila uporabljeni pri različnih rastlinah kot že prej omenjeno (Aranjuelo in sod., 2011; Deeba in sod., 2012; Sergeant in sod., 2011; Wang, 2014; Zadražnik in sod., 2013; Zhou in sod., 2015). Vsekakor pa ni lahko določiti, kateri izmed pristopov je bolj primeren, saj se zeleni listi rastlin v stresu med seboj zelo razlikujejo v vitalnosti, senescenca listov pa lahko na rastlini različno napreduje (npr. enakomerno, hierarhično - od spodaj navzgor) (Zhao in sod., 2015). Zaradi tega sklepamo, da smo pri fizioloških meritvah uspeli izmeriti zapiranje listnih rež, zmanjšano delovanje fotosinteze, medtem ko rezultati proteomske analize bolj nakazujejo na prikaz splošnega slabjenja rastline oz. senescence listov. Pri rezultatih proteomske analize lahko sklepamo, da je vključenost več rumenih listov v analizo, pomenilo prevladovanje proteinov, povezanih s senescenco. Zaradi teh proteinov, povezanih s senescenco, pa so bili proteini ki pa so direktno vezani v rastlini na odziv na sušo v okolju manj številčno zastopani v rezultatih naše raziskave. V drugih raziskavah se je pokazalo sicer podobno, saj je veliko raziskav, kjer niso našli proteinov (oz. so jih našli malo), ki so direktno vezani na odgovor rastline na sušo (kot so LEA proteini, dehidrini, HSP,...) (Durand in sod., 2011, Deeba in sod., 2012, Sergeant in sod., 2011). Pri omenjenih raziskavah pa je bilo vzorčenje drugačno kot v našem primeru, saj so vzeli le enega ali do štiri liste z rastline in ne liste cele rastline kot v našem primeru. Zato sklepamo da je razlog, da nismo uspeli identificirati več proteinov, ki so direktno vezani v odgovor na sušo v tem, da so ti proteini v rastlini v manjšem deležu glede na proteine osnovnega metabolizma. Ker smo bili mi omejeni s s številom proteinov ki jih bomo identificirali zaradi finančnega vložka, smo se odločali za identifikacijo tistih proteinskih lis, ki so bile na gelih dovolj velike in dovolj statistično značilne. To je eden izmed glavnih razlogov, da identifikacija s suši povezanih proteinov ni bila bolj uspešna, poleg tega pa je tudi še nekaj tehničnih razlogov, ki razlagajo tudi to, da Vennovi dijagrami nakazujejo razlike med sortama, medtem ko tisti proteini ki smo jih identificirali, veliko manj. Prvi razlog je lahko razlika v občutljivosti barvil za barvanje gelov. Večji del proteinskih lis z zmanjšano vsebnostjo proteinov, ki smo jih na DIGE gelih zaznali, na preparativnih gelih (kjer smo uporabili barvilo Comassie blue) nismo zaznali, kar je onemogočilo njihovo identifikacijo. Kot drugi možni razlog je slaba kakovost MS spektrov pri nekaterih proteinskih lisah, ki so bili pravzaprav tako slabe kakovosti, da je bila identifikacija takšnih proteinskih lis neuspešna. Tretji razlog za slabšo identifikacijo je, da hmeljevih proteinov še ni v bazah podatkov, kar posledično pomeni, da je ujemanje sekvenc ki smo jih določili, slabše, saj se primerjajo z sekvencami v drugih rastlinah. Poleg tega smo (ne glede na to ali gledamo blag, srednji ali močan sušni stres) pri večini proteinov ugotovili,

da se proteinska lisa postopoma povečuje ali zmanjšuje, kar nam lahko tudi daje eno informacijo o tem kakšen je odziv hmelja na sušo, saj so pri več drugih kmetijskih rastlinah pri določenih proteinih ugotovili da se v blagem sušnem stresu lahko vsebnost proteina najprej poveča ali zmanjša, v hujši suši pa se zgodi obratno.

Kar nekaj različno izraženih proteinov smo našli v več lisah (torej proteini katerih vsebnost se poveča/zmanjša v vseh identificiranih proteinskih lisah ali z drugimi besedami isti identificirani protein v različnih lisah), za kar predvidevamo, da gre za post-translacijske modifikacije. Predvidevane naloge identificiranih proteinov, ki so pri hmelju v prisotni v sušnem stresu so razložene v nadaljevanju.

5.1.2.1 Proteini udeleženi v procesu metabolizma sladkorjev

Določili smo dva proteina vključena v glikolizo in imata spremenjeno vsebnost v rastlinah, izpostavljenih suši: gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) ter fosfoglicerat kinaza (PGK). GAPDH je katalizator pri redukciji 1,3-fosfoglycerata ter gliceraldehid-3-fosfata do trioze fosfata, ki je glavna reakcija glikolize (Xu in sod., 2013). GAPDH smo identificirali v proteinskih lisah številka 1001, 1197, 1198, kjer se je vsebnost omenjenega proteina zmanjšala v rastlinah izpostavljenih sušnem stresu, tudi bolj očitno pri sorti SG kot pri AU. Ekstremno zmanjšanje vsebnosti proteina GAPDH je bilo opaziti v proteinski lisi številka 1001, medtem ko v proteinskih lisah številka 1197 in 1198 (kjer je šlo za podenoto A pri GAPDH) najdeno postopno zmanjšanje vsebnosti z naraščajočim stresom pri SG, vendar pri AU takšno stopnjevanje z naraščajočim stresom ni opaženo. Na podalgi raziskave (Hancock in sod., 2005) lahko sklepamo da je na zmanjšanje vsebnosti GAPDH vplivala prisotnost H_2O_2 . Kar nekaj objav je bilo najdenih, kjer ima GAPDH pomembno vlogo v odgovoru na sušni stres (Aranjuelo in sod., 2011; Bazargani in sod., 2011; Faghani in sod., 2015; Oliver in sod., 2011; Pandey in sod., 2007; Shi in Chan, 2014; Zhou in sod., 2015). Vloga encima GAPDH je bila pojasnjena z vključitvijo v razgradnjo H_2O_2 (Baek in sod., 2008). Povezano med GAPDH in H_2O_2 so raziskovali Hancock in sod., (2005) ter ugotovili, da GAPDH reagira s H_2O_2 , pri tem pa se GAPDH preoblikuje tako, da deluje kot signalna molekula v suši, H_2O_2 pa se pri tem porablja. Medtem ko so Baek in sod. (2008) ugotovili tudi, da se na splošno povečana ekspresija GAPDH kaže v zmanjšanju koncentracije ROS in tudi v povečani odpornosti rastlin na celično smrt zaradi vročinskega šoka. Bazargani in sod. (2011) so pri pšenici identificirali GAPDH v treh različnih proteinskih lisah z različnih izražanjem. Xu in sod. (2013) so po drugi strani našli povečanje GAPDH v občutljivi sorti travniške latovke, medtem ko pri tolerantni sorti niso našli nobenih sprememb v izražanju proteina GAPDH. Zadražnik in sod. (2013) domnevajo, da povečanje GAPDH nakazuje na povečano potrebo po dodatni energiji za lažje premagovanje sušnega stresa ter za popravljanje njegove škode.

PGK je najbolj znan zaradi njegove vloge v glikolizi, saj katalizira pretvorbo 1,3-bifosfoglicerata v 3-fosfoglicerat. Omenjeni encim je prav tako prisoten tudi v nekaterih drugih metabolnih poteh, kot je glioksilatna pot, sinteza aminokislin, glukoneogeneza, redoks uravnavanje katalitične aktivnosti z oksidacijskimi ter redukcijskimi koencimi (Yao in sod., 2011). Kloroplastni PGK je vključen v redukcijsko stopnjo Calvinovega cikla, v reakciji, kjer se s pomočjo ATP 3-fosfoglicerat fosforilira do 1,3-bifosfoglicerata. PGK smo identificirali v proteinskih lisah številka 1061, 1064 ter 1065, kjer smo ob povečanem sušnem stresu v vseh lisah ugotovili zmanjšano vsebnost proteina. Parker in sod. (2006) poročajo o povečani vsebnosti PGK zaradi solnega stresa, ob tem pa nakazujejo, da je omenjeni encim povezan s povečano porabo ogljika pri procesu fotosinteze, kar povezujejo s povečano CO₂ koncentracijo v listih.

Kot del metabolizma sladkorjev smo kot v suši različno izražen protein identificirali tudi malat dehidrogenazo (MDH) v proteinski lisi številka 1585. Pri sorti AU se je vsebnost proteina MDH zmanjšala bolj kot pri sorti SG v sušnem stresu. Med sušnim stresom so našli povečano aktivnost genov, ki kodirajo MDH v bolj tolerantnih in občutljivih sortah fižola (Recchia in sod., 2013). Prav tako so Yao in sod. (2011) opazili povečano izražanje genov, ki kodirajo MDH pri jablani, kar so povezali z rastjo celic ter odpornostjo na solni stres ter stres zaradi nizkih temperatur. Po drugi strani so Li in sod. (2013) poročali, da zmanjšana vsebnost proteina MDH med vročinskim stresom pri lucerni pripomore k zaviranju ter zmanjšanju energijskega metabolizma. Na podlagi zaznanih encimov, vključenih v metabolizem sladkorjev predvidevamo, da sušni stres pri hmelju zavira metabolizem ogljikovih hidratov, s posledicami na procesih energijskega metabolizma, vključenih v odgovor rastline na sušni stres.

Fruktoza-bifosfat aldolaza je protein, ki smo ga identificirali v proteinskih lisah številka 1249 in 3658. Gre za encim, ki katalizira razklop ali kondenzacijo fruktoze-1,6-bifosfat v dihidroacetofosfat in gliceraldehid 3-fosfat, ki je pomemben korak v procesu glikolize. Funkcijske analize so pokazale vključenost genov, ki regulirajo delovanje fruktoze-bifosfat aldolaze za rast in razvoj rastline, ter v odgovorih na stres (Lu in sod., 2012; Moon in sod., 2012). Znanih je več študij, kjer so opazili manjšo vsebnost fruktoza-bifosfat aldolaze med sušnim stresom (Aranjuelo in sod., 2011; Gong in sod., 2010; Moon in sod., 2012). Poleg tega povezujejo manjšo vsebnost omenjenega proteina z delovanjem abscizinske kisline. Glede na omenjene študije smo našli tudi pri hmelju manjšo vsebnost dveh izoform fruktoze-bifosfat aldolaze pri obeh sortah. Manjša vsebnost citosolne izoforme encima je glede na študije lahko povezana z splošnih zaviranjem energijskega metabolizma (kot smo to ugotovili že pri PGK, GAPDH in MDH), medtem ko manjša vsebnost kloroplastne izoforme encima kaže na spremembe v asimilaciji ogljika ter njegovi alokaciji. Ugotovljeno je, da tudi zmersno zmanjšanje aktivnosti plastidne aldolaze vpliva na zmanjšanje fotosinteze ter posledično vpliva na nivo sladkorjev ter škroba (Haake in sod., 1998). To bi lahko tudi v našem primeru prispevalo k dodatnemu zmanjšanju aktivnosti fotosinteze (poleg npr.

stomatalnih omejitvev), ki smo ga potrdili z meritvami izmenjave plinov. Poleg tega je proteomska analiza pokazala, da je zmanjšanje vsebnosti proteina aldolaze bolj očitno pri sorti SG, zaradi česar bi lahko bil to tudi indikator občutljivosti na sušo pri hmelju.

Rezultati naše raziskave kažejo, da so GAPDH, PGK in MDH udeleženi energijski metabolizem ob napredajoči suši, ki je vedno bolj inhibiran, kar pa ni v skladu z nekaterimi drugimi raziskavami, ki so pokazale povečano aktivnost glikolize in Krebsovega cikla zaradi povečane potrebe po dodatni energiji rastline.

5.1.2.2 Proteini udeleženi v procesu fotosinteze

Največje število identificiranih proteinov s spremenjenimi vsebnostmi v sušnem stresu hmelja je povezanih s procesi fotosinteze. Fotosinteza je eden izmed prvih procesov, ki ga sušni stres prizadene, predvsem zaradi zaprtja listnih rež ter nižjega vodnega potenciala. Poleg tega je fotosinteza prizadeta direktno zaradi inhibicije asimilacije CO₂, presežna svetloba pa tako poškoduje fotosintetski sistem (Hopkins in Hüner, 2008; Chaves in sod., 2009).

V naši raziskavi smo določili več proteinov vključenih v fotosintezo: feredoksin-NADP reduktazo (v proteinski lisi številka 1495), v dveh proteinskih lisah (številki 3655 in 3653) pa smo identificirali kompleks za oksidacijo vode ter domnevni PDII-P protein kot del procesa fotosinteze, kjer katalizira zadnjo reakcijo v elektronski verigi, kjer nastajata NADPH in ATP v kloroplastih. Poleg tega so bili drugi identificirani proteini vključeni v fotosintezo: Rubisco ter Rubisco aktivaze. Naše fiziološke meritve kažejo trend zmanjševanja neto fotosinteze sorazmerno s povečevanjem sušnega stresa. Bilo je za pričakovati, da se je podobno pokazalo tudi z rezultati proteomske analize. Fotosintetski kompleks za oksidacijo vode temelji na kompleksu za oksidacijo vode (OEC) v fotosistemu II (PSII) (Vrettos in sod., 2001). OEC zaradi njegove naloge, da oksidira vodo, posledično tvori molekularni kisik, ki je vir elektronov v fotosistemu I (PSI) (Hopkins in Hüner, 2008). Oliver in sod. (2011) so poročali o relativni občutljivosti OEC ter o njegovi povezavi s PSII, kar povzroča zmanjšanje fotosinteze pri rastlinah tolerantnih na sušni stres. V naši raziskavi je bila z naraščajočim sušnim stresom ugotovljena zmanjšana vsebnost kompleksa za oksidacijo vode v njegovih dveh izoformah. Jiang in sod. (2007) so OEC opisali kot enega izmed proteinov, ki z njihovo zmanjšano vsebnostjo spadajo med signalne proteine v začetnem stanju sušnega stresa. Skladno z zgoraj napisanim smo našli tudi manjšo vsebnost proteina PSII-P (proteinska lisa številka 2166) pri obeh sortah v sušnem stresu.

Feredoksin-NADP reduktaza je flavoprotein in je vključen v ciklične in ne-ciklične fosforilacijske reakcije v fotosintezi. Omenjeni protein katalizira zadnji korak v elektronski verigi pri nastanku NADPH v kloroplastu rastlin med fotosintezo. Shi in sod. (2014) so opisali povečano aktivnost feredoksin-NADP reduktaze pri bermudski travi, izpostavljeni

sušnemu stresu, prav tako smo v naši raziskavi pri hmelju izpostavljenem sušnemu stresu našli zmanjšano vsebnost feredoksin-NADP reduktaze, kar nakazuje na zmanjšan ciklični elektronski transport.

Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco) je najbolj razširjen encim na Zemlji. Razlog je njegova pomembna vloga v fotosintezi, saj katalizira ključno reakcijo pri asimilaciji ogljika. Visoka afiniteta Rubisca do CO₂ regulira delovanje omenjenega encima v karboksilaciji ribuloze-1,5-bisfostata (RuBP) (Shi in sod., 2014; Oliver in sod., 2011). Rubisco je sestavljen iz velike podenote, ki jo kodira kloroplastni genom, ter majhne podenote, ki jo kodira jedrni genom. Naloga Rubisco aktivaze je, da sprošča sladkorne fosfate kot je RuBP z aktivnega mesta Rubisca (vezani imajo sicer inhibitorni učinek), da lahko CO₂ aktivira Rubico s procesom karbamilacije. V našem primeru smo pri stresiranem hmelju ugotovili zmanjšano vsebnost male podenote Rubisca (proteinska lisa številka 3605) in tudi zmanjšano vsebnost več izoform encima Rubisco aktivaze (proteinske lise številka 1055, 1054, 1053, 900 in 896). Dobljeni rezultati nakazujejo inhibicijo fotosinteze, ko je stopnja sušnega stresa pri hmelju visoka, poleg tega je nakazano, da v tem stanju proces fiksacije ogljika ne poteka.

Fosforibulokinazo (PRK) smo identificirali v proteinski lisi številka 1111. Gre za encim, ki katalizira reakcijo regeneracije RuBP med procesom asimilacije ogljika. Poleg tega PRK regulira regeneracijo RuBP po njegovem zmanjšanju v času sušnega stresa (Xu in sod., 2013). V naši raziskavi smo identificirali PRK z zmanjšano vsebnostjo v sušnem stresu hmelja, vendar je bilo zmanjšanje bolj očitno pri sorti SG kot pri AU. V raziskavi Xu in sod. (2013) so pri travniški latovki ob sušnem stresu odkrili zmanjšanje aktivnosti PRK, v času regeneracije, po stresu pa neno povečano aktivnost. Njihovi rezultati nakazujejo, da encim PRK po prenehanju suše verjetno sodeluje v mehanizmih za ponovno vzpostavljanje fotosinteze ob regeneraciji rastlin. Poleg tega so zmanjšano vsebnost PRK našli tudi pri lucerni (Aranjuelo in sod., 2011). Avtorji navajajo, da je manjše izražanje genov (ki uravnava encime in ki so vključeni v Kalvinov cikel) povezano s povečano vsebnostjo sladkorja v listih rastlin v sušnem stresu. Pri tem pa moramo upoštevati, da sladkorji delujejo kot signalne molekule v rastlinah, izpostavljenih sušnemu stresu (Chaves in sod., 2009).

5.1.2.3 Proteini udeleženi v procesu metabolizma dušika

Encim glutamin sintetaza (GS), ki smo ga identificirali v proteinskih lisah številka 1132, 1139, 1013, ima vlogo v vgradnji preko korenin sprejetega dušika v aminokisline. Hoshida in sod. (2000) so odkrili povečano toleranco na solni stres pri rižu v povezavi s povečanim izražanjem genov, ki kodirajo kloroplastno glutamin sintetazo. V naši raziskavi je bil encim GS identificiran v treh proteinskih lisah, in sicer v proteinskih lisah številka 1132 in 1139 se je njegova vsebnost v sušnem stresu povečala, medtem ko se je pri proteinski lisi številka

1013 njegova vsebnost zmanjšala. Zmanjšanje vsebnosti GS vodi v smrt rastline zaradi inhibicije fotorespiracije, ker se porabijo vse aminokisline (Pascual in sod., 2008). Singh in Ghosh (2013) so v svoji raziskavi uporabili dve sorti riža, ki se razlikujeta po odpornosti na sušni stres. V občutljivi sorti so našli manjšo aktivnost GS, medtem ko pri tolerantni večjo aktivnost GS med sušnim stresom. Cai in sod. (2009) so našli povečano izražanje genov, ki kodirajo aktivnost GS in takšno izražanje genov označili za večjo toleranco na abiotski stres pri rižu. V naši raziskavi nismo našli sortnih razlik v vsebnosti GS v sušni izpostavljenih rastlinah hmelja.

Alanin aminotransferaza (AlaAT) je encim, ki katalizira reverzibilni prenos amino skupine z glutamata do piruvata, da se lahko tvori 2-oksoglutarat in alanin (Miyashita in sod., 2007). V več rastlinskih vrstah je bila regulacija AlaAT že raziskana, saj je encim vključen v odziv na stres zaradi pomanjkanja kisika, svetlobe in dušika. Good in Zaplachinski (1994) sta ugotovila povečanje AlaAT med regeneracijo oljne ogrščice po sušnem stresu. V naši raziskavi je bila najdena zmanjšana vsebnost encima AlaAT s povečevanjem sušnega stresa brez signifikantnih razlik med sortama.

5.1.2.4 Protein povezan z metabolnimi potmi ROS

Laktoilglutation liaz (LGL) smo identificirali v proteinski lisi številka 1419. Encim katalizira tvorbo S-laktoilglutationa s pretvorbo hemimerkapt (ki se tvori iz metiloksala in glutationa). LGL je poznan tudi kot glioksalaza I (Witzel in sod., 2009). Glioksalazni sistem je sestavljen iz glioksalaze I (gly I) in glioksalaze II (gly II). Gly I katalizira tvorbo S-D laktoilglutationa, kjer je GSH kofaktor reakcije, medtem ko Gly II katalizira tvorbo D-laktata ter regeneracijo GSH (Yadav in sod., 2005). GSH je ena glavnih komponent, ki so vključene v regulacijo redoks potenciala v celici (Singla-Pareek in sod., 2003). GSH je reducirana oblika glutationa, ki se v stresnih razmerah v rastlini pojavlja v oksidirani obliki (GSSG, glutation disulfid). V askorbatno-glutationsko verigo je GSH vključen kot donor elektronov pri tvorbi askorbata iz oksidirane oblike (dehidroaskorbat), kar predstavlja glavni proces odstranjevanja superoksida in peroksida iz kloroplastov (Tausz in sod., 2004). Singla-Pareek in sod. (2003) so poročali o izboljšani toleranci na solni stres pri tobaku v povezavi v povečanim izražanjem genov, ki regulirajo Gly I in Gly II. Prav tako so Pandey in sod. (2007) našli povečano količino Gly pri čičeriki v sušnem stresu, zaradi česar domnevajo, da Gly odstranjuje ROS iz celic. V naši raziskavi smo identificirali Gly I, katerega vsebnost se je v sušnem stresu povečala. Ker je znanih nekaj raziskav, kjer omenjeni encim povezujejo s povečano odpornostjo na solni stres (Pandey in sod., 2007; Yadav in sod., 2005; Singla-Pareek in sod., 2003), predvidevamo, da je Gly I eden izmed možnih indikatorjev tolerance na sušni stres pri hmelju in bi lahko bil eden izmed možnih potencialnih molekularnih označevalcev za toleranco na sušni stres.

5.1.2.5 Proteini udeleženi v raznih procesih

Avksin-vezavni protein, ki smo ga identificirali v proteinski lisi števila 2364 je vključen v izražanje proteina avksina kot njegov receptor v membrani. Hopkins in Hüner; 2008). Ob sušnem stresu bi lahko bilo delovanje avksina pomembno zaradi njegove vloge pri tvorbi korenin in uravnavanju razrasti koreninskega sistema. Ob suši se korenine odzovejo z drugačno rastjo, ena izmed prilagoditvenih strategij je tvorba kratkih korenin ter koreninskih laskov, ki jo vzpodbuja avksin (Veranian in sod., 1994). Farooq in sod. (2012) so opisali, da se ob suši vsebnost avksina zmanjšuje, ker je v nasprotju s povečevanjem koncentracije abscizinske kisline. Durand in sod. (2011) so opisali zmanjšanje vsebnosti avksin-vezavnega proteina v topolu, ki je bil izpostavljen sušnemu stresu. V naši raziskavi smo identificirali povečanje omenjenega proteina v hmelju, ki je izpostavljen sušnemu stresu, bolj izrazito pri sorti AU kot pri SG. Poleg tega so podobno pri hmelju v raziskavi Korovetske in sod. (2015) našli povečane koncentracije indol-3-ocetne kisline (IAA), apartat indol-3-ocetne kisline (IAA-Asp) ter oksindol-3-ocetne kisline (ox IAA) v listih hmelja, ko je bil hmelj izpostavljen sušnemu stresu. Tako potrjujejo, da ima avksin pomembno vlogo v odzivu hmelja na sušni stres.

RNA vezavni protein (RBP) je vključen v transkripcijo, RNA procesiranje, lokalizacijo, stabilnost ter translacijski proces (Shida in sod., 2015). Različno izražanje RBP se lahko pojavlja v zelo različnih izoformah, kot je bilo najdeno pri čičeriki (Pandey in sod., 2007). V naši raziskavi smo pri listih hmelja, izpostavljenih sušnemu stresu našli eno od izoform RBP, katere vsebnost se je v sušnem stresu zmanjšala.

Serin hidrometil transferaza (SHMT) je vključena v fotorespiratorno pot, kjer katalizira medsebojno pretvorbo serina in glicina. Fotorespiracija je metabolna pot, kjer je CO₂ sproščen preko svetlobe in je povezan s Calvin-Bensonovim ciklom preko aktivnosti Rubisca kot oksigenaze. Namreč Rubisco deluje kot oksigenaza zaradi povečanja koncentracije O₂, ko je sušni stres močnejši in je koncentracija CO₂ nižja kot v normalnih pogojih (Farooq in sod., 2012). Fotorespiracija je alternativna strategija za premagovanje oksidativnega stresa kot ena izmed možnosti za odstranjevanje odvečne energije ali zmanjševanje njene moči za preprečevanje fotoinhibicije (Hoshida in sod., 2000; Farooq in sod., 2012; Wingler in sod., 2000). Metabolita kot sta serin in glicin se v celicah pojavljata, da zagotavlja glicin za sintezo glutationa, ki je del antioksidativnega sistema v rastlinah. Poročali so o povečani vsebnosti SHMT zaradi nestomatalne inhibicije fotosinteze (Ji in sod., 2012). Drugi raziskovalci našli zmanjšano vsebnost SHMT, ki lahko v solnem stresu vodi do tvorjenja H₂O₂ (Zhou in sod., 2013). V naši raziskavi smo našli SHMT v proteinski lisi številka 651 v obeh sortah v zmanjšani vsebnosti.

Obe sorte sta se podobno odzvali na opisane pogoje sušnega stresa, kar se je pokazalo z meritvami ki smo jih opravili. Fiziološke meritve so pokazale zelo stabilno vodno bilanco

predvsem zaradi zaprtih listnih rež, medtem ko so rezultati proteomske analize bolj pokazali splošno slabšanje rastline zaradi scenescene (ki je posredno tudi posledica suše). Kljub vsemu pa smo pri vseh proteinskih lisah, ki smo jih identificirali, našli in opisali njihovo vlogo pri odzivu na sušo. Za boljši vpogled bi bilo vsekakor potrebno identificirati večje število proteinskih lis. V tem primeru bi zagotovo uspeli identificirati še več direktno s sušo povezanih proteinov.

5.2 SKLEPI

Rezultate doktorske naloge lahko povzamemo v naslednjih sklepih:

1. Hmelj se na sušne razmere v okolju odziva z zmanjšano prevodnostjo listnih rež, posledično se zmanjša tudi transpiracija. Omejena prevodnost listnih rež se odraža v zmanjšanju fotosinteze, kar kaže na stomatalno inhibicijo. Vsi izmerjeni parametri, nam omogočajo vpogled v fiziološko stanje hmelja in kažejo podoben odziv obeh sort hmelja (AU in SG) ob pomanjkanju vode.
2. Ob izpostavitvi hmelja sušnemu stresu smo dokazali, da se spremeni proteinski profil v listih. Glede na druge objavljene raziskave smo ugotovili, da so tisti proteini, katerih vsebnost se spremeni, povezani z odzivom rastline na sušni stres. Večina teh proteinov je vključena v splošno presnovo rastline, njihova vsebnost pa pada, kar kaže na splošno slabitev rastline. Po drugi strani smo identificirali malo proteinov, ki so neposredno udeleženi pri obrambi pred stresom.
3. S proteomsko analizo rastlin izpostavljenih sušnim razmeram smo glavne spremembe določili v metabolizmu sladkorjev, poteku fotosinteze, metabolizmu dušika, metabolnih poteh ROS. Naša raziskava je pokazala, da se obe sorte ob pomanjkanju vode na proteomskem nivoju listov podobno odzivata.
4. Spremenjen proteinski profil listov hmelja sovpada s fiziološkimi meritvami zmanjšanja procesa fotosinteze (zabeležili smo zmanjšanje 10 proteinov, v večini več različnih oblik encima rubiska, katerega vsebnost se je zmanjševala skladno s povečevanjem pomanjkanja vode). Izpostavila pa bi dejstvo, da so bile pri mnogih proteinih kvantitativne spremembe skladne z ravnjo suše (večje povečanje/zmanjšanje ob močnejši suši).
5. Zelo pomembna je identifikacija proteina lakoilglutation liaze, saj je del glioksalaznega sistema. Vsebnost lakoilglutation liaze se je v listih hmelja povečala, zaradi česar predvidevamo, da je omenjeni protein eden izmed možnih indikatorjev tolerance na sušni stres pri hmelju, zato bi lahko bil ob nadaljnjih raziskavah možen potencialni molekularni označevalec.

Sklepa 1. in 2. potrjujeta prvi del prve hipoteze, da se hmelj odziva na pomanjkanje vode z omejevanjem prevodnosti listnih rež. Po drugi strani pa s sklepom 3 zavrzemo drugi del prve hipoteze, da se bo takšen odziv pri obeh sortah različno izrazil, saj nismo določili značilnih razlik med sortama v odzivu hmelja na sušni stres.

Drugo hipotezo lahko delno potrdimo od sklepa 3 do sklepa 5, saj smo predpostavili, da se ob pomanjkanju vode spremeni proteinski profil v listih ter da je spremenjenena vsebnost proteinov neposredno povezani z odzivom hmelja na sušni stres. Namreč večji del identificiranih je povezani s splošnim slabanjem rastline, kar se s sušo povezano posredno, le nekaj identificiranih proteinov je bilo s sušo povezanih neposredno.

Prvi del tretje hipoteze ne moremo niti zavreči niti potrditi, saj nismo odkrili proteinov, ki bi bili direktno povezani z uravnavanjem vodne bilance rastline hmelja. Drugi del tretje hipoteze lahko delno potrdimo le delno, saj smo direktno povezavo z obrambo pred oksidativnem stresu našli le pri enem proteinu (LGL), GAPDH pa je z oksidativnim stresom povezan le posredno.

Zadnjo, četrto hipotezo lahko v prvem delu potrdimo, saj smo uspeli povezati rezultate fizioloških meritev ter proteinske slike v sklepom 4. Vendar drugi del četrte hipoteze ne moremo niti potrditi, niti zavreči, saj nismo določili razlik med sortama in zato nismo mogli primerjati bolj in manj prizadetih rastlin med sabo.

Naša raziskava je prva, kjer smo s proteomskim pristopom raziskovali odziv hmelja na sušni stres. Rezultati takšne raziskave so nam omogočili kar nekaj pomembnih informacij o odzivu hmelja na sušo in nam odpirajo nove poti v nadaljnje raziskave na tem področju. Pri tem pa vemo, da se moramo predvsem osredotočiti na optimalnejše vzorčenje ter strmeti k iskanju tolerantne ter odporne sorte hmelja in se nato vrniti na iskanje razlik med tema sortama.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Sušni stres ima na hmelj tako kot na druge kmetijske rastline velik vpliv, saj zelo zmanjšuje pridelek ter njegovo kakovost. Kljub temu, da se v zadnji letih pojavljajo nove objave raziskav odziva hmelja na sušni stres, njegov odziv še vedno ni podrobno znan. Natančnejše razumevanje mehanizmov odziva hmelja na sušni stres bi doprineslo pomembna znanja v proces žlahtnjenja in bi omogočilo razvoj sort, ki bi bile bolj tolerantne na pomanjkanje vode. To nas je motiviralo k raziskavi, v kateri smo uporabili kombinacijo proteomskega ter konvencionalnega fiziološkega metodološkega pristopa da bi dobili še boljši vpogled v mehanizme hmelja pri odzivu na pomanjkanje vode.

Veliko pozornost smo namenili optimalni postaviti poskusa, z namenom, da bi v poskus vključili čim bolj izenačene rastline hmelja, ter da bi imeli čim boljši nadzor nad stopnjevanjem suše. Tako so rezultati proteomske raziskave še bolj relevantni in lahko več dejavnikov, ki bi sicer vplivali na proteinsko sestavo lista, izključujemo. V lončnem poskusu smo uporabili izenačene, v tkivni kulturi namnožene rastline. Zalivanje rastlin smo izvajali na osnovi poznavanja vodno zadrževalnih lastnosti substrata, tako smo lahko v posameznih fazah poskusa vzpostavili želeno vsebnost vode v substratu. Rastline v sušnih razmerah smo tako postopoma vzorčili v šestih različnih časovnih točkah, kjer je bilo pomanjkanje vode z vsakim dnem vzorčenja večje, preostale rastline v kontrolnih razmerah pa smo optimalno zalivali. Med potekom celotnega poskusa smo spremljali tudi razmere v rastlinjaku. Na osnovi meritev temperature lahko zaključimo, da rastline niso bile izpostavljene previsokim temperaturam.

Rezultati meritev fizioloških parametrov so pokazali, da ima hmelj zelo stabilno vodno bilanco, saj so vrednosti relativne vsebnosti vode v listih padle šele, ko je bil sušni stres že zelo močan. Podobno so pokazali tudi rezultati meritev vodnega potenciala. Zaradi zelo majhnih sprememb v vodnem potencialu smo hmelj uvrstili med izohidre rastline. Zaznali smo tudi zmanjšanje listne površine pri hmelju kot eno izmed posledic vpliva pomanjkanja vode. Izboljšana učinkovitost izrabe vode se je izkazala pri hmelju v blagem sušnem stresu zaradi zmanjšanja stomatalne prevodnosti, ki posledično omejuje tudi transpiracijo. Zmanjšala se je tudi fotosinteza zaradi zmanjšane stomatalne prevodnosti, kar označujemo kot stomatalno inhibicijo. Meritve fotokemične učinkovitosti so nam po drugi strani pokazale, da je sušni stres pri hmelju vplival tudi na procese na tilakoidi. Pri vseh omenjenih parametrih, nismo uspeli zaznati takšnih razlik v meritvah, da bi našli različen fiziološki odziv na sušni stres med vključenima sortama hmelja.

Proteine lista hmelja smo analizirali z metodo 2D-DIGE ter določili 3664 unikatnih proteinskih lis od katerih jih je bilo 534 prisotnih na 80 % gelov. Z enosmerno ANOVO smo

določili 132 statističnih sprememb v proteinskih lisah pri sorti SG in 143 pri sorti AU. Glede na statično značilnost in ponovljivost smo 44 proteinskih lis analizirali s tandemsko masno spektrometrijo (MALDI-TOF/TOF), od katerih smo jih 28 uspešno identificirali. Med vsemi identificiranimi proteinskimi lisami, jih je bilo 9 vključenih v metabolizem sladkorjev (identificirani kot gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, fosfoglicerat kinaza, malat dehidrogenaza ali fruktoza-bifosfat aldolaza), 11 v proces fotosinteze (identificirani kot feredoksin-NADP reduktaza, ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza ali fosforibulokinaza), 4 v proces metabolizma dušika (identificirani kot glutamin sintetaza ali alanin aminotransferaza), in 1 v proces metabolnih poti ROS (identificiran kot laktoilglutation liaza). Identificirali smo tudi 3 proteinske lise, uvrščene v različne procese v celici (auksin-vezavni protein, RNA vezavni protein, serin hidrometil transferaza).

Proteomska analiza je pokazala, da so procesi ogljikovega metabolizma v sušnem stresu pri hmelju najbolj prizadeti. Veliko zmanjšanje proteinov, vključenih v fotositezo in energijski metabolizem je verjetno povezano z varčevanjem energije pri hmelju v sušnem stresu, po drugi strani pa je lahko to le rezultat splošnega oslabitve rastline.

Najboljše smo rezultate proteinske slike s fiziološkimi meritvami lahko povezali pri procesu fotosinteze. Fiziološke meritve so namreč pokazale trend zmanjševanja fotosinteze s stopnjevanjem sušnega stresa. Po drugi strani pa so rezultati proteomske analize pokazali, da se s stopnjevanjem sušnega stresa vedno bolj zmanjšanje vsebnost proteinov, ki so pomembni za potek fotosinteze (npr. rubisco aktivaza/oksigenaza, kompleks za oksidacijo vode). Na podlagi navedenega lahko tudi sklepamo, da se je fotosinteza zmanjšala tudi zaradi zmanjšane vsebnosti omenjenih proteinov.

Rezultati naše raziskave so nam razkrili dodatne informacije, ki nam lahko pomagajo pri razumevanju mehanizmov pri odzivu hmelja na sušni stres. Rezultati so zelo uporabni in pomembna iztočnica za nadaljnje raziskave pri razumevanju mehanizmov hmelja ob pomanjkanju vode. Pri ponovnem poskusu je potrebno še več pozornosti nameniti pri postavljanju poskusa in pridobivanju vzorcev, predvsem kako vzorčiti. Sicer pa je raziskave smiselno nadaljevati predvsem v bolj tarčnem iskanju mehanizmov pri hmelju v odzivu na sušo.

6.2 SUMMARY

The drought stress has a big impact on crop plants, including hop, because it reduces crop yield and its quality. In spite of new published researches in the last years, hop response to drought stress is not well understood yet. Detailed understanding of hop stress mechanisms to drought would contribute important knowledge in breeding process to develop cultivars, tolerant to water deficit. This motivated us for the research in which the combination of methods (proteome analysis and conventional physiology methods) were used with purpose to obtain better insight into hop response to water deficit.

High importance was given to optimal experiment design with the purpose to have the most possible equated hop plants and in order to have the best possible control over the escalation of drought. The results of proteome analysis were more relevant because the more environmental factors (which could have the effect on leaf protein composition) were excluded. In pot experiment, the equated hop plants, multiplied from tissue cultures, were used. The plants were watered based on best knowledge of water retention properties of the substrate, this is why we were able to establish the desired relative water content in substrate during the individual phases. Plants exposed to drought stress were gradually sampled in six time stages, where water deficit increased every day, the plants in control conditions were optimally watered. During the experiment we monitored the conditions in the greenhouse, to be sure that plants were not exposed to high temperatures too.

The results of physiological measurements revealed that hop has a very stable water balance, because the relative water content values in leaves dropped only when drought was very severe. Similar results were obtained with water potential measurements. Extremely small changes in water potential lead us to classify hop into isohydric plants. One of the drought stress effects on hop plants was a decrease in leaf area. The better water use efficiency in hop under drought stress was obtained because of a decrease in stomatal conduction with the effect on transpiration. A decrease in photosynthesis was measured because of the decrease in stomatal conductance, which indicated stomatal inhibition of photosynthesis. Photochemical efficiency measurements show us the drought stress effect on thylakoid. We were not able to find any differences between included hop cultivars in response to drought stress among all measured parameters.

Leaf proteins were analyzed with 2D-DIGE method and 3664 unique spots were determined, from which 534 were presented at 80 % gels. One-way ANOVA revealed 132 statistically significant changes in protein spots for cultivar SG and 143 for AU. According to the statistical significance and reproducibility, the 44 protein spots were analyzed with tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF), out of which 28 were successfully identified. Among all the identified protein spots, 9 of them were classified into sugar metabolism (identified as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, malate

dehydrogenase or fructose-bisphosphate aldolase), 11 into photosynthesis process (identified as ferredoxin-NADP reductase, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase or phosphoribulokinase), 4 into nitrogen metabolism (identified as glutamine synthetase or alanine aminotransferase), 1 into ROS related pathway (identified as lactoylglutathione lyase) and 3 protein spots, which were classified into different processes in cell (auxin-binding protein, putative RNA binding protein and serine hydroxymethyltransferase).

Proteomic analysis also showed the carbon metabolism to be most affected. There was a strong decrease in photosynthetic proteins and proteins of the energetic metabolism. This may be related to more conservative energy use during stress response but, on the other hand, it may only reflect a general decrease of plant fitness.

With our best knowledge we were able to connect proteome analysis results with physiological measurements for photosynthesis. Physiological measurements revealed a decreasing trend of photosynthesis with progressive drought. On the other hand, the results of proteome analysis showed a decrease of proteins, important for photosynthesis, with more severe drought stress. This is the reason to conclude that decreased photosynthesis resulted in the reduction of protein content.

The results of our research give us the information which enables us to understand the hop response to drought stress. These results are a useful and important starting point for further researches to understand hop mechanisms during water deficit. Greater attention must be paid to experimental design and sampling when repeating the experiment. Otherwise, it makes sense to continue research in more target search of hop mechanisms to drought stress.

7 VIRI

- Abid G., M'hamdi M., Mingeot D., Aouida M., Aroua I., Muhovalski Y., Sassi K., Souissi F., Mannai K., Jebara M. 2016. Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in faba bean (*Vicia faba L.*). Archives of Agronomy and Soil Science, 63, 4: 536-552
- Alam I., Sharmin S. A., Kim K., Yang J. K., Choi M. S., Lee B. 2010. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. Plant and Soil, 333: 491-505
- Andrade J. L., Meinzer F. C., Goldstein G., Schnitzer S. A. 2005. Water uptake and transport in lianas and co-occurring trees of a seasonally dry tropical forest. Trees, 19, 3: 282-289
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avice J. C., Nogués S. 2011. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa L.*). Journal of Experimental Botany, 62: 111-123
- Baek D., Jin Y., Jeong J. C., Lee H., Moon H., Lee J., Shin D., Kang C. H., Kim C. H., Nam J., Lee S. Y., Yun D. 2008. Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Phytochemistry, 69: 333-338
- Bazargani M. M., Sarhadi E., Bushehri A. S., Matros A., Mock H., Naghavi M., Hajihoseini M. M., Hajirezaei M., Moradi F., Ehdaie B., Salekdeh G. H. 2011. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. Journal of Proteomics, 74: 1959-1973
- Benešová M., Holá D., Fischer L., Jedelský P.L., Hnilička F., Wilhelmová N., Rothová O., Kočová M., Procházková D., Honnerová L., Hniličková H. 2012. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? PLoS One, 7: e38017, doi:10.1371/journal.pone.0038017: 17 str.
- Bray E. A. 1997. Plant responses to water deficit. Trends in plant science, 2, 2: 48-54
- Cai H., Zhou Y., Xiao J., Li X., Zhang Q., Lian X. 2009. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. Plant Cell Reports, 28: 527-537
- Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. 2003. Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. Functional Plant Biology, 30: 239-264
- Chaves M. M., Pereira J. S., Marocco J., Rodrigues M. L., Ricardo C. P. P., Osório M. L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. 2002. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. Annals of Botany, 89: 907-916
- Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany, 103: 551-560
- Claeys H., Inze D. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. Plant Physiology, 162: 1768-1779
- Čeh B., Čerenak A., Majer D. 2009. Potassium and proline content in hop leaves as biochemical marker for drought stress tolerance. Hmeljarski bilten, 16: 43-52

- Čeh, B., Kač, M., Košir, I. J., Abram, V. 2007. Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. International Journal of Molecular Sciences, 8, 9: 989-1000
- Čerenak A. 2017. "Rumenenje spodnjih listov pri sorti SG". Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (osebni vir, januar, 2017)
- Čerenak A., Razinger J., Drinovec L., Čremožnik B., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2010. Physiological response of hop (*Humulus lupulus L.*) plants to drought stress. Hmeljarski bilten, 17: 34-43
- Čremožnik B., Kmapič M., Sirše B., Arnš A. 2008. Strokovna naloga za potrebe namakanja v spodnji savinjski dolini. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivoarstvo Slovenije: 53 str.
- Deeba F., Pandey A. K., Ranjan S., Mishra A., Singh R., Sharma Y. K., Shirke P. A., Pandey V. 2012. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum L.*) to drought stress. Plant Physiology and Biochemistry, 53: 6-18
- Dhingra V., Gupta M., Andacht T., Fu Z.F. 2005. New frontiers in proteomics research: A perspective. International Journal of Pharmaceutics, 299, 1–2: 1-18
- Donko M., Košir I. J., Kač M. 2003. Polifenoli-pomembni sekundarni metaboliti hmelja-preliminarne raziskave kultivarjev hmelja v Sloveniji. Hmeljarski bilten, 10: 31-38
- Domec J. C., Johnson D. M. 2012. Does homeostasis or disturbance of homeostasis in minimum leaf water potential explain the isohydric versus anisohydric behaviour of *Vitis vinifera L.* cultivars? Tree Physiology, 32, 3: 245-248
- Durand T. C., Sergeant K., Renaut J., Planchon S., Hoffmann L., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J. F. 2011. Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. Journal of Proteomics, 74: 1396-1410
- Faghani E., Gharechahi J., Komatsu S., Mirzaei M., Khavarinejad R. A., Najafi F., Farsad L. K., Salekdeh G. H., 2015. Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. Journal of Proteomics, 114: 1-15
- Ferant N. 2012. Hmelj. V: Hmelj - od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivoarstvo Slovenije: 13-14
- Ferant N., Košir I. J., 2012. Kemijiske lastnosti hmelja. V: Hmelj - od sadike do storžkov, Čeh B. (ur.), Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivoarstvo Slovenije: 20 str.
- Fan L.M., Zhao Z.X., Assmann S.M. 2004. Guard cells: a dynamic signaling model. Current Opinion in Plant Biology, 5, 7: 537-546
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development, 29: 185–212
- Farooq M., Hussain M., Wahid A., Siddique K. H. M. 2012. Drought stress in plants: an overview. V: Plant responses to drought stress from morphological to molecular features. Aroca R. (ur.). London: 1-33
- Fenta B. A., Driscoll S. P., Kunert K. J., Foyer C. H. 2012. Characterization of drought-tolerance nodulated soya beans: the importance of maintaining photosynthesis and shoot

- biomass under drought-induced limitations on nitrogen metabolism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198: 92–103
- Fonovič M. 2008. Proteomika - veda ali tehnologija, V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10
- Foyer C. H., Noctor G. 2011. Ascorbate and Gluthathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155: 12-18
- Franks P. J., Drake P. L., Froend R. H. 2007. Anisohydric but isohydrodynamic: seasonally constant plant water potential gradient explained by a stomatal control mechanism incorporating variable plant hydraulic conductance. *Plant, Cell & Environment*, 30: 19-30
- Gallé Á., Jolán C., Benyó D., Lasakay G., Levczky T., Erdei L., Tari I. 2013. Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: Biosynthesis and function of ABA in stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 170: 1389-1399
- Gilbert M. E., Medina V. 2016. Drought Adaptation Mechanisms Should Guide Experimental Design. *Trend in Plant Science*, 21, 8: 639-647
- Gloser V., Baláz M., Svoboda P. 2011. Analysis of anatomical and functional traits of xylem in *Humulus lupulus L.* stems. *Plant, Soil and Environment*, 57: 338–343
- Gloser V., Baláz M., Jupa R., Korovetska H., Svoboda P. 2013. The response of *Humulus lupulus* to drought: the contribution of structural and functional plant traits. *Acta Horticulturae*, 1010: 149-154
- Gong P., Zhang J., Li H., Yang C., Zhang C., Zhang X., Khurram Z., Zhang Y., Wang T., Fei Z., Ye Z. 2010. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3563-3575
- Good A. G., Zaplachinski S. T. 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 1: 9-14
- Hancock J. T., Henson D., Nyirenda M., Desikan R., Harrison J., Lewis M., Hughes J., Neill, S. J. 2005. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 828-835
- Hladnik J., Vodnik D. 2007. Regulacija prevodnosti listnih rež. *Acta agricultura Slovenica*, 89, 2: 147-157
- Hopkins W. G., Hüner N.P.A. 2008. Introduction to plant physiology. 4th izd. The University of Western Ontario: 503 str.
- Hoshida H., Tanaka Y., Hibino T., Hayashi Y., Tanaka A., Takabe T., Takabe T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology*, 43: 103-111
- IHGC. 2016. IHGC (International Hop Growers' Convention).
<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/obj.htm> (november, 2016)

- IHPS. 2017. Katalog sort hmelja.
<http://www.ihps.si/raziskave-in-razvoj/publikacije/katalogi-sort-hmelja/> (januar, 2017)
- IPCC. 2013. Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker T. F., Qin D., Plattner G. K., Tingor M., Allen S. K. Boschung J., Mauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P. M. (ur.). Cambridge University Press
http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_reports.shtml (november, 2016)
- Issaq H. J. 2001. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis*, 22: 629-3638
- Ji K., Wang Y., Sun W., Lou Q., Mei H., Shen S., Chen H. 2012. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, 169: 336-344
- Jiang G., Wang Z., Shang H., Yang W., Hu Z., Phillips J., Deng X. 2007. Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. *Planta*, 225: 1405-1420
- Jones H. 2007. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 119-130
- Jones H. G. 2014. Plants and Microclimate, third ed. Cambridge University Press: 407 str.
- Jupa R., Baláž M., Svoboda P., Glosér V. 2013. Inherent variability in structural and functional traits of xylem among three hop varieties. *Plant Soil Environment*, 59, 6: 273-279
- Jupa R., Plavcová L., Flamiková B., Glosér V. 2016. Effects of limited water availability on xylem transport in liana *Humulus lupulus L.*. *Envionmental and Experimental Botany*, 130: 22-32
- Knapič M., Čremožnik B. 2012. Namakanje. V: Hmelj - od sadike do storžkov, Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 74-93
- Kolenc Z., Čerenak A., Vodnik D. 2014. Kako hmelj (*Humulus lupulus L.*) uravnava vodno bilanco in se odziva na sušo? *Hmeljarski bilten*, 21: 5-13
- Komatsu S., Hossain Z. 2013. Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in Plant Science*, 4, 71: 1-9
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I., Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress-Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74: 1301-1322
- Korovetska H., Novák O., Jůza O. 2014. Signaling mechanisms involved in the response of two varieties of *Humulus lupulus L.* to soil drying: I. changes in xylem sap pH and the concentrations of abscisic acid and anions. *Plant Soil*, 380: 375-387
- Korovetska H., Novák O., Turečková V., Hájíčková M., Glosér V. 2015. Signalling mechanisms involved in the response of two varieties of *Humulus lupulus L.* to soil

- drying: II. changes in the concentration of abscisic acid catabolites and stress-induced phytohormones. *Plant Growth Regulation*, 78: 13. doi:10.1007/s10725-015-0058-6
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. *Hmeljarski bilten*, 4: 73-83
- Kralj D., Zupanec J., Vasilij D., Kralj S., Pšeničnik J. 1991. Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus L.* *Journal of the Institute of Brewing*, 97: 197-206
- Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 31. januar in 1. februar 2008. Raspored P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-32
- Lambers H., Chapin S. F., Pons T. L. 2008. *Plant physiological ecology*. New York, Springer-Verlag: 540 str.
- Larcher W. 2003. *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4th edition. New York, Springer: 513 str.
- Lawlor D., Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294
- Li W., Wei Z., Qiao Z., Wu Z., Cheng L., Wang Y. 2013. Proteomics Analysis of Alfalfa Response to Heat Stress. *PLoS ONE*; 8: e82725, doi:10.1371/journal.pone.0082725: 11 str.
- Lu W., Tang X., Huo Y., Xu R., Qi S., Huang J., Zheng C., Wu Z. 2012. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene*, 503: 65-74
- Majer D. 1995. Vpliv namakanja, števila vodil in števila poganjkov na vodilo na količino pridelka in na vsebnost alfa kislin. *Hmeljarski bilten*, 4: 31-34
- Majer D. 1997. Vodni stres pri hmelju (*Humulus lupulus L.*) cv. "Savinjski golding", doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 173 str.
- Majer D. 1999. Vpliv vodnega stresa na pridelek hmelja (*Humulus lupulus L.*). *Hmeljarski bilten*, 6: 21-31
- Majer D. 2000a. Vodni stres pri hmeljnih rastlinah ali o pomenu vode za življenje rastlin, o stresu pri rastlinah, o namakanju in o vplivu vodnega stresa na hmeljne rastline. Žalec, Hmeljarsko združenje Slovenije: 109 str.
- Majer D., 2000b. Vpliv sušnega stresa na vsebnost makrohranil v hmeljnih rastlinah (*Humulus lupulus L.*). *Hmeljarski bilten*, 7: 5-13
- Martinčič A. 1984. Mala flora Slovenije, 2. izdaja. Ljubljana, Državna založba Slovenije, 793 str.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., Breshears D.D., Cobb N., Plaut J., West A., Williams D. G., Yepez E. A. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*, 178: 719–739
- Mishra A., Singh V. 2010. A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, 391, 1-2: 202-216

- Miyashita Y., Dolferus R., Isamod K. P. 2007. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 49: 1108-1121
- Moon S. J., Shin D. J., Kim B. G., Byun M. O. 2012. Putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase 1 (AtFBA1) affects stress tolerance in yeast and *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biotechnology*, 39: 106-113
- Mohammadi P. P., Nouri M.-Z., Komatsu S. 2012. Proteome Analysis of Drought-Stressed Plants. *Current Proteomics*, 9: 232-244
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 15, 3: 473–497
- Murakami A., Darby P., Javornik B., Pais MSS., Seiger E., Lutz A., Svoboda P. 2006. Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus L.* *Heredity*, 97: 66-74
- Muthurajan R., Shobbar Z., Jagadish S. V. K., Bruskiewich R., Ismail A., Leung H., Bennet J. 2010. Physiological and proteomic responses of rice peduncles to drought stress. *Molecular Biotechnology*, 48: 173-182
- Naglič B., Cvejić R., Pintar M. 2016. Pregled objav s področja namakanja hmelja (*Humulus lupulus L.*) na porečju Savinje. *Hmeljarski bilten*, 26: 41-55
- Naglič B., Pintar M. 2013. Preučitev možnosti zmanjšanja porabe vode pri kapljični tehnologiji namakanja hmelja. *Hmeljar*, 75, 1/12: 50-51
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Oliver M. J., Jain R., Balbuena T. S., Agrawal G., Gasulla F., Thelen J. J. 2011. Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration. *Phytochemistry*, 72: 1273-1284
- Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran L. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1-8
- Pandey A., Chakraborty‡ S., Datta A., Chakraborty§ N. 2007. Proteomics Approach to Identify Dehydration Responsive Nuclear Proteins from Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Molecular & Cellular Proteomics*. 7: 88-107
- Pascual M., Jing Z., Kirby E., Cánovas F. M., Gallardo F. 2008. Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinothricin. *Phytochemistry*, 69: 382-389
- Parker R. Flowers T. J., Moore A. L., Harpham N. V. J. 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1109-1118
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<https://www.R-project.org/> (avgust, 2015)
- Recchia G. H., Caldas D. G. G., Beraldo A. L. A., da Silva M. J., Tsai S. M. 2013. Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Internal Journal of Molecular Sciences*, 14: 7155-7179

- Reddy A. R., Chaitanya K. V., Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 11: 1189-1202
- Reynolds-Henne C. E., Langenegger A., Mani J., Schenk N., Zumsteg A., Feller, U. 2010. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 1: 37-43
- Rodziewicz P., Swarcewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., Stobiecki M. 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1-19
- Schultz H.R. 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera L.* cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1393-1405
- Sergeant K., Spieß N., Renault J., Wilhelm E., Hausman J. F. 2011. One dry summer: A leaf proteome study on the response of oak to drought exposure. *Journal of Proteomics*, 74: 1385-1395
- Scholander P.F., Hammel H.T., Hemmingsen E.A., Bradstreet E.D. 1964. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52: 119-125
- Singh K., Ghosh S. 2013. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa L.*) cultivars under water deficit conditions. *Plant Cell Reports*, 32: 183-193
- Singla-Pareek S., Reddy M. K., Sopory S. K. 2003. Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 14672-14677
- Small E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*, 3: 37-76
- Shi H., Ye T., Chan Z. 2014. Comparative proteomic responses of two bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) varieties contrasting in drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 218-228
- Shida T., Fukuda A., Saito T., Ito H., Kato A., 2015. AtRBP1, which encodes an RNA-binding protein containing RNA-recognition motifs, regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92: 62-70
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221-227
- Svoboda P., Hiniličková H., Hiniličks F. 2008. Changes in yield and quality of hop depending on the irrigation. V: Alps-Adria Scientific workshop, Stara Lesna, Slovakia: 891-894
- Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malus domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 164 str.

- Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th edition. Sunderland, Sinauer Associates Inc. Publishers: 764 str.
- Taylor N. L., Heazlewood‡ J. L., Day§ D. A., Millar¶ A. H. 2005. Differential Impact of Environmental Stresses on the Pea Mitochondrial Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4: 1122-1133
- Tausz M., Šircelj H., Grill D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: Is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, 44, 404: 1955-1962
- Tomás M., Medrano H., Escalona J. M., Martorell S., Pou A., Ribas-Carbó M., Flexas J. 2014. Variability of water use efficiency in grapevines. *Environmental and Experimental Botany*, 103: 148-157
- Turner N.C. 1981. Techniques and experiment approaches for the measurement od plant water status. *Plant and Soil*, 58: 339-366
- Turyagyenda L. F., Kizito E. B., Ferguson M., Baguma Y., Agaba M., Harvey J. J., Osiru D. S. 2013. Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava. *AoB Plants*, 5: plt007, doi:10.1093/aobpla/plt007: 17 str.
- Vilagrosa A., Chirino E., Peguero-Pina J. J., Barigah T. S., Cochard H., Gil-Pelegrín E. 2012. Xylem cavitation and embolism in plants living in water – limited ecosystems. V: Plant responses to drought stress from morphological to molecular features. Aroca R. (ed.). London: 63-109
- Vartanian N., Marcotte L., Giraudat H. 1994. Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 104: 761-767
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 139 str.
- Vrettos J. S., Limburg J., Brudvig G. W. 2001. Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1503: 229-245
- Wang L. 2014. Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83: 243-249
- Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27, 13: 2782-2786
- Wagner T. 1983. The quantity and composition of bitter resins-chemotaxonomic characteristics of hop varieties. *Pharmaceutical Journal of Slovenia*, 34: 77-83
- Wingler A., Lea P. J., Quick W. P., Leegood R. C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, 355: 1517-1529
- Witzel K., Weidner A., Surabhi G., Borner A., Mock H. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3545-3557

- Xu L., Yu J., Han L., Huang B. 2013. Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. *Environmental and Experimental Botany*, 89: 28-35
- Yadav S., Singla-Pareek S. L., Ray M., Reddy M. K., Sopory S. K., 2005. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337: 61-67
- Yao Y., Dong Q., Zhai H., You C., Hao Y. 2011. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 257-264
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2013. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Proteomics*, 78: 254-272
- Zhao P., Liu P., Shao J., Li C., Wang B., Guo X., Yan B., Xia Y., Peng M. 2015. Analysis of different strategies adapted by two cassava cultivars in response to drought stress: ensuring survival or continuing growth. *Journal Of Experimental Botany*, 66: 1477-1488
- Zhang Y., Huang X., Wang L., Wei L., Wu Z., You M., Li B. 2014. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 13: 919-925
- Zhou S., Li M., Guan Q., Liu F., Zhang S., Chen W., Yin L., Qin Y., Ma F. 2015. Physiological and proteome analysis suggest critical roles for the photosynthetic system for high water-use efficiency under drought stress in *Malus*. *Plant Science*, 236: 44-60
- Zhou H., Zhao J., Yang Y., Chen C., Liu Y., Jin X., Chen L., Li X., Wang Deng X., Schumaker K. S., Guo Y. 2013. Ubiquitin-specific protease16 modulates salt tolerance in *Arabidopsis* by regulating Na⁺/H⁺ antiport activity and serine hydroxymethyltransferase stability. *The Plant Cell*, 24, 12: 5106-5122
- Zupanec J. 1991. Kemične instrumentalne metode v analitiki hmelja. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo*, 57: 133-144

ZAHVALA

Posebna zahvala mentorici doc. dr. Andreji Čerenak za vse dragocene strokovne nasvete, ideje in usmerjanje med raziskovalnim delom. Brez tebe naloga ne bi nastala takšna kot je in jaz pri tem ne bi postala toliko modrejša in razumenjša. Tvoji nasveti so nekaj najdragocenijega ne le pri nadalnjem raziskovalnem delu ampak tudi v življenju.

Zahvala somentorju prof. dr. Dominik Vodnik, saj brez tebe naše objave ne bi bile takšne kot so. Tudi tvoja pomoč pri pisanju naloge in članka je bila res posebna, saj znaš s svojim pedagoškim pristopom študenta pripeljati do zanimivih razmišljanj in tako zelo dobro usmerjaš nas raziskovalce začetnike v prave raziskovalce.

Zahvala prof. dr. Branki Javornik za sodelovanje pri načrtovanju eksperimenta ter da ste mi omogočili delo v vaših laboratorijih, kjer sem se res ogromno naučila. Zahvala tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin ne le za pomoč in nasvete ampak tudi za dobro vzdušje med delom. Posebna zahvala pa dr. Stanislavu Mandelcu, Slavc res hvala za vse vikend inštrukcije in vso pomoč kjerkoli in kadarkoli sem jo potrebovala.

Zahvala prof. dr. Damijani Kastelec za vso pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvala vsem sodelavcem na IHPS, ki so kakorkoli pripomogli pri izvajanju našega poskusa, predvsem sodelavcem oddelka ORTO za vse nasvete, pomoč pri delu in spodbudne besede.

Zelo sem vesela, da ste tudi članice komisije tako strokovno, s polno nasveti pripomogle k nadgradnji naloge, tudi vam hvala za vse komentarje.

In na koncu zahvala še mojim domačim – staršem za spodbudne besede. In posebna zahvala vama: tebi Matej za vso podporo in potrpežljivost ter tebi Nace, ki si s svojimi nasmeški čez dan poskrbel da večerno pisanje nikoli ni bilo prenaporno ☺