

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja FRANKO

**ŠTUDIJ SUŠNEGA STRESA PRI RASTLINAH IZ
DRUŽINE GESNERIACEAE NA RAVNI PROTEOMA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja FRANKO

**ŠTUDIJ SUŠNEGA STRESA PRI RASTLINAH IZ DRUŽINE
GESNERIACEAE NA RAVNI PROTEOMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DROUGHT STRESS IN PLANTS FROM THE FAMILY
GESNERIACEAE AT THE LEVEL OF THE PROTEOME**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

POPRAVKI:

“Dobrota je
pomembnejša od
modrosti,
in zavedanje tega je
začetek
modrosti.”

Theodore Isaac Rubin

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani na Odseku za biotehnologijo.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Polono Jamnik, za somentorico dr. Marjetko Kidrič in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Somentorica: dr. Marjetka Kidrič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Polona Jamnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Marjetka Kidrič

Institut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo

Član: doc. dr. Blaž Cigić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Franko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.112:581.17:632.112(043)=163.6
KG fiziologija rastlin/rastlinske celice/listi/stres/suša/proteomika/proteinski profil listov/Gesneriaceae/afriška vijolica/*Saintpaulia ionantha* H. Wendl./ ramonda/*Ramonda serbica* Panč./oživitve sposobne rastline/vsebnost vode/ relativna vsebnost vode/dvodimenzionalna gelska elektroforeza/masna spektrometrija
AV FRANKO, Maja
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/KIDRIČ, Marjetka (somentorica)/CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2010
IN ŠTUDIJ SUŠNEGA STRESA PRI RASTLINAH IZ DRUŽINE GESNERIACEAE NA RAVNI PROTEOMA
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 72 str., 15 pregl., 11 sl., 1 pril., 90 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Suša je za rastline velik stres, proti kateremu se borijo na zelo različne načine. V naši raziskavi smo preučevali rastlinski vrsti iz družine Gesneriaceae, ki se po svojem odzivu na sušni stres povsem razlikujeta, kar smo pokazali s spremeljanjem morfoloških sprememb listov in merjenjem vsebnosti vode v njih. Afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) je v pomanjkanju vode vztrajala skoraj 3 mesece, na koncu se je posušila. Pri ramondi (*Ramonda serbica* Panč.) je bil čas do suhe faze izrazito krajsi, vendar je bila po rehidraciji, kljub popolni izsušitvi svojih vegetativnih tkiv, še vedno sposobna ponovne oživitve. Z uporabo dvodimenzionalne gelske elektroforeze smo imeli vpogled v spremembe vsebnosti proteinov v rastlinskih celicah med sušnim stresom. Proteom smo preučevali v ekstraktih listov kontrolnih rastlin, ki so bile redno zalivane, in rastlin, ki so bile izpostavljene različno dolgim fazam suše. Rezultati so pokazali na velike razlike v spremembah proteinskega profila obeh vrst rastlin, zlasti v fazi popolne izsušitve. Pri afriški vijolici je tekom faz suše prišlo do znižanja izražanja večine proteinov, pri ramondi pa je suša povzročila *de novo* sintezo večjega števila proteinov. Slednji so najverjetneje ključnega pomena za sposobnost ponovne oživitve ramond. Izmed diferencialno izraženih proteinov smo z uporabo masne spektrometrije identificirali 3 potencialno zanimive proteine, in sicer beta podenoto proteasoma ter encim pektin metilesterazo pri afriški vijolici, pri ramondi pa encim Rubisco.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.112:581.17:632.112(043)=163.6
CX plant physiology/plant cells/leaves/drought/stress/proteomics/protein leaves profile/Gesneriaceae/african violet/*Saintpaulia ionantha* H.Wendl./ramonda/*Ramonda serbica*Panč./resurrection plants/water content/relative water content/two-dimensional gel electrophoresis/mass spectrometry
AU FRANKO, Maja
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/KIDRIČ, Marjetka (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI DROUGHT STRESS IN PLANTS FROM THE FAMILY GESNERIACEAE AT THE LEVEL OF THE PROTEOME
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 72 p., 15 tab., 11 fig., 1 ann., 90 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Drought is a profound stress for plants, against which they fight in many ways. In our study we investigated two plant species from the family Gesneriaceae which differ completely in their response to drought stress, as we showed by following morphological changes of their leaves and measuring their water content. African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) persisted under conditions of water deficit for almost three months, then eventually dried and died. Ramonda (*Ramonda serbica* Panč.) reached the dried state, however it revived upon rehydration, despite its vegetative tissues having been almost completely desiccated. An insight into the changes of protein content in plant cells during drought stress has been obtained, using two dimensional gel electrophoresis. The proteome was analyzed in leaf extracts of control plants that were regularly watered, and in plants subjected to long periods of drought. Large differences were observed in the changes in protein profiles of the two plants, especially at the stage of complete desiccation. In african violet expression of the majority of proteins decreased during the drought phases, while in ramonda drought caused *de novo* synthesis of a number of proteins. The latter probably play a key role in the ability of ramonda to revive. Using mass spectrometry three potentially interesting proteins were identified – the beta subunit of the proteasome and pectin methylesterase in african violet, and Rubisco (large subunit) in ramonda.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1. 1 NAMEN DELA	2
1. 2 DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ODZIV RASTLIN NA SUŠO	4
2.1.1 Načini adaptacije rastlin na sušo.....	5
2.1.2 Molekularne osnove odziva rastlin na sušo	6
2.1.2.1 Zaznavanje in prenos signala o pomanjkanju vode	7
2.1.2.2 Osmotsko prilagajanje ali osmoregulacija	9
2.1.2.3 Strukturne prilagoditve	10
2.1.2.4 Zaščita celičnih struktur	11
2.1.2.5 Mehanizmi za popravilo škode.....	13
2.1.3 Homoiohidrične rastline.....	14
2.1.3.1 <i>Saintpaulia</i> sp.....	15

2.1.4 Poikilohidrične rastline	16
2.1.4.1 <i>Ramonda</i> sp.	16
2.2 PROTEOMIKA.....	20
2.2.1 Priprava bioloških vzorcev za proteomske analize	21
2.2.2 Dvodimenzionalna gelska elektroforeza	22
2.2.3 Identifikacija proteinov	22
3 MATERIALI IN METODE.....	24
3.1 POTEK DELA	24
3.2 MATERIALI.....	25
3.2.1 Rastlinski material.....	25
3.2.2 Reagenti in raztopine.....	25
3.2.3 Pribor in oprema	29
3.3 METODE.....	32
3.3.1 Priprava rastlinskega materiala.....	32
3.3.1.1 Gojenje afriške vijolice	32
3.3.1.2 Gojenje ramonde.....	33
3.3.2 Določanje vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnosti vode (RVV) v listih ..	34
3.3.2.1 Določanje VV	34
3.3.2.2 Določanje RVV	35
3.3.3 Priprava celičnih ekstraktov iz listov - ekstrakcija proteinov	35
3.3.4 Določanje koncentracije proteinov v ekstraktih.....	36
3.3.5 Čiščenje proteinskih ekstraktov	36
3.3.6 Dvodimenzionalna elektroforeza	37
3.3.6.1 Prva dimenzija	37
3.3.6.2 Druga dimenzija	39
3.3.7 Detekcija proteinov na gelu.....	40
3.3.8 Slikanje gelov in računalniška obdelava slik	41
3.3.9 Identifikacija proteinov	41

4 REZULTATI.....	43
4.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE (VV) IN RELATIVNE VSEBNOSTI VODE (RVV) TER SPOSOBNOSTI REHIDRACIJE	43
4.2 VPLIV SUŠE NA IZRAŽANJE PROTEINOV IN PRIMERJAVA SPREMemb PROTEINSKIH PROFILOV	47
4.3 IDENTIFIKACIJA IZBRANIH PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	55
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	56
5. 1 RAZPRAVA	56
6 POVZETEK	62
7 VIRI	64

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava pufra za ekstrakcijo proteinov.....	25
Preglednica 2: Sestava raztopine za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom ...	26
Preglednica 3: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm za SDS-PAGE.....	27
Preglednica 4: Sestava pufra za uravnoteženje IPG trakov – osnovni.....	27
Preglednica 5: Sestava agarozne raztopine	28
Preglednica 6: Sestava 5x SDS elektroforetskega pufra	28
Preglednica 7: Sestava 1x SDS elektroforetskega pufra	28
Preglednica 8: Sestava fiksacijske raztopine	29
Preglednica 9: Sestava raztopine za razbarvanje	29
Preglednica 10: Vzorci rastlinskega materiala (afriška vijolica), ki smo ga uporabili pri analizah.....	33
Preglednica 11: Vrednosti vode v listih (VV), relativne vseb. vode v listih (RVV) in vsebnosti vode v zemlji (VVz), morfološke lastnosti rastlin in njihova sposobnost rehidracije v povezavi z različno dolgimi fazami suše pri afriški vijolici.....	45
Preglednica 12: Vrednosti vode v listih (VV) ter morfološke lastnosti rastlin pri ramondi.....	47
Preglednica 13: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih afriške vijolice v 4. fazi suše	51
Preglednica 14: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih ramonde v suši	54
Preglednica 15: Seznam identificiranih proteinov	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka dela	24
Slika 2: Vpliv trajanja izpostavljenosti pomanjkanju vode na afriško vijolico	44
Slika 3: Vpliv trajanja izpostavljenosti pomanjkanju vode na ramondo	46
Slika 4: Prikaza reprezentativnih 2-DE gelov kontrole in posameznih faz suše pri afriški vijolici.....	48
Slika 5: Vpliv trajanja suše na izražanje proteinov v afriški vijolici – primer 2-D elektroforetskih lis.....	49
Slika 6: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise v programu 2-D Dymension	50
Slika 7: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnem vzorcu afriške vijolice	51
Slika 8: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu 4. faze suše (64 dni) afriške vijolice.....	52
Slika 9: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu 5. faze suše (3 meseci) afriške vijolice.	52
Slika 10: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnih vzorcih ramonde	53
Slika 11: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih ramonde v suši	54

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABA	abscizinska kislina
APS	amonijev persulfat
BFM	bromfenolmodro
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	(ang. 3-[(3-cholamidopropyl) dymetylamonio]-1-propanesulfonate)
ddH ₂ O	bidestilirana voda (Milli Q voda)
DHN	dehidrini (ang. dehydrin)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
ESI	elektrosprej ionizacija
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH gradient
JAA	jodoacetamid
kDa	10^3 Da (Da = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
LEA	proteini pozne embriogeneze (ang. Late-Embryogenesis-Abundant proteins)
M	mol/L
MALDI	ionizacija tripsinskih fragmentov v matriksu z desorpcijo z laserjem
MPa	10^3 Pa
mRNA	translacijska ribonukleinska kislina
MS	masna spektometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
pI	izoeletrična točka
PVP	polivinilpirolidon
RAB	proteini, odzivni na abscizinsko kislino
ROS	reakтивne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
RsK	<i>Ramonda serbica</i> ; kontrolna, redno zalivana rastlina
RsS	<i>Ramonda serbica</i> ; rastlina, izpostavljena 19. dnem suše
Rubisco	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
RVV	relativna vsebnost vode v listih

SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
SpK1	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 1. kontrola (redno zalivana)
SpK2	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 2. kontrola (redno zalivana)
SpS1	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 1. faza suše (10. dni suše)
SpS2	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 2. faza suše (20. dni suše)
SpS3	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 3. faza suše (35 dni suše)
SpS4	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 4. faza suše (64 dni suše)
SpS5	<i>Saintpaulia ionantha</i> , 5. faza suše (3 meseci suše)
TCA	triklorocetna kislina
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tris-HCl	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol, vodikov klorid
v/v	mL/100 mL
VV	vsebnost vode v listih
VV _z	vsebnost vode zemlje
w/v	g/100 mL
Ψ_w	vodni potencial (MPa)
2-DE	dvodimenzionalna gelska elektroforeza

1 UVOD

Prve preproste (najbrž enocelične) rastline so se pojavile na Zemlji pred približno milijardo let. Danes kraljestvo rastlin obsega nekaj sto tisoč različnih vrst in so osnova življenja na Zemlji. Omogočajo preživetje vseh drugih bitij, saj je večina ostalih oblik življenja posredno ali neposredno odvisna od rastlinske hrane. Nasprotno pa je večina rastlin sposobna sama izdelovati hrano s pomočjo sončne svetlobe v procesu fotosinteze.

Večino mase rastlinskega tkiva predstavlja voda. Rastline jo neprestano absorbirajo skozi korenine in jo oddajajo skozi liste. Ko je izgubljanje vode s transpiracijo skozi liste večje od privzema vode, pride do pomanjkanja vode oziroma suše (Bray, 1997). Poznamo rastline, ki same niso sposobne uravnavati svojega vodnega stanja ter torej spreminjajo vsebnost vode v svojih tkivih v skladu z dinamiko vodnega režima okolja (Hieng in Kidrič, 2001). Te spadajo v skupino poikilohidričnih rastlin. Med homoihidrične pa spadajo tiste rastline, ki so lahko vzdržujejo razmeroma stabilno vlažnost svojih tkiv.

Skoraj vse rastline so med rastjo in razvojem večkrat izpostavljene pomanjkanju vode, ki je med pogostimi in najbolj škodljivimi abiotskimi stresi. V prednosti so tiste rastlinske vrste, ki so v evoluciji razvile učinkovite fiziološke in biokemijske mehanizme odgovora na sušo, ti pa so tako raznoliki, kot so rastline same (Hieng in Kidrič, 2001). Suši prilagojenim rastlinam je po večini skupno dejstvo, da morajo vedno izbirati med lakoto (če ne odprejo rež in ne bo dovolj CO₂) ter žejo (če odprejo reže in jim pri tem uhaja voda).

Nekatere rastline so razvile čisto posebno strategijo za preživetje v sušnih obdobjih. Govorimo o rastlinah, ki so sposobne oživitve po popolni izsušitvi vegetativnih tkiv, poimenujemo pa jih tudi kot rastline, ki prenesejo izsušitev (angl. desiccation tolerant plants) oz. celo kot rastline, ki lahko vstanejo od mrtvih (angl. resurrection plants) (Hieng in Kidrič, 2001). Pri pomanjkanju vode zapadejo v stanje anabioze, med katero se metabolizem v celicah skoraj popolnoma ustavi, po ovlažitvi pa hitro spet »oživijo« in se povrnejo v stanje popolne biološke aktivnosti (Quartacci in sod., 2002).

Kljud temu, da smo še daleč od popolnega razumevanja, kakšne posledice povzroči suša na rastlinah in kakšni so odzivi rastlin nanjo, danes vseeno že vemo, da so rastline, ki so tolerantne na popolno izsušitev, razvile še bolj učinkovite mehanizme zaščite proti vodnemu stresu, kot ga imajo »normalno« tolerantne rastline. Glavna med njimi sta zagotovo zaščita celovitosti celic in popravilo poškodb povzročenih med dehidracijo ali rehidracijo (Cooper in Farrant, 2002).

Proteini so nosilci večine bioloških funkcij. Pojem proteom zajema celokupen nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu v določenem trenutku. Da bi razumeli, kako celice delujejo, je potrebno raziskovati, kateri proteini so prisotni, kje se nahajajo, kako interagirajo z drugimi molekulami in katere funkcije opravljajo tekom razvoja ali v različnih stresnih stanjih (Križaj, 2008), med katere sodi tudi sušni stres. Pri preučevanju odzivov rastlin na sušo in iskanju ključnih proteinov na tem področju so nam v veliko pomoč analize proteinskih profilov.

1. 1 NAMEN DELA

Rastlinski material v naši raziskavi sta bili vrsti iz družine Gesneriaceae, in sicer afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.), ki spada med homoiohidrične rastline, ter ramonda (*Ramonda serbica* Panč.), ki je poikilohidrična rastlina. Obe spadata med višje rastline, imenovane tudi brstnice, ki so najbolj razvita skupina rastlin. Po svojem odzivu na sušni stres se povsem razlikujeta. Afriška vijolica pomanjkanje vode dlje časa tolerira, vendar na koncu propade, ramonda pa v suši hitro zapade v anabiozo in je tako zmožna preživeti dolgotrajno popolno dehidracijo celične protoplazme brez trajnih poškodb.

Namen raziskovalnega dela diplomske naloge je bil ugotoviti, kako sušni stres vpliva na proteom teh dveh rastlinskih vrst. Želeli smo dokazati, da obstajajo pomembne razlike v odzivu omenjenih rastlinskih vrst na ravni proteoma in da je tu ključen razlog za različen fiziološki odziv in sposobnosti preživetja v stresnih razmerah.

1. 2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da faza popolne izsušitve povzroči različen odziv rastlin iz družine gesnerevk na sušo. Pri afriški vijolici smo pričakovali represijo sinteze večine proteinov, ki bi se stopnjevala vse do propada rastline. Pri ramondi pa smo želeli dokazati morebitno povečano izražanje nekaterih proteinov in tudi *de novo* sintezo večjega števila proteinov, za katere smo predvidevali, da so ključnega pomena za izjemno sposobnost te rastlinske vrste – ponovne oživitve po popolni dehidraciji svojih vegetativnih tkiv.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODZIV RASTLIN NA SUŠO

Rastlinske vrste so zelo različno odporne na premoščanje abiotiskih stresov (Bohanec in sod., 2004). Skoraj vse pa so med rastjo in razvojem večkrat izpostavljene različnim stresnim razmeram, od katerih je pomanjkanje vode med pogostimi in najbolj škodljivimi.

Voda je za rastline, tako kot za ostala žive organizme, življenskega pomena ter predstavlja 80 - 95 % mase rastlinskega tkiva, večina pa se je v rastlinski celici nahaja v vakuoli (Taiz in Zeiger, 2006). Voda ima veliko različnih vlog v celici in vpliva na strukturo in lastnosti bioloških molekul. Pomembna je kot topilo oz. medij za skoraj vse metabolne reakcije ter kot reaktant (Boyer, 2005). Vodni potencial (Ψ_w) je mera za razpoložljivost vode in je za čisto vodo enak nič, v rastlinskih tkivih pa je vedno negativen, ker so v vodi raztopljeni številne snovi. Vrednost vodnega potenciala je odvisna od pogojev v okolju, v katerem rastlina raste. Pri dobi preskrbljenosti rastlin z vodo je ta približno -0,1 do -0,5 MPa, pri blagi suši -1,0 do -1,5 MPa, v zelo sušnem okolju pa celo do -3,0 MPa (McKersie in Leshem, 1994). Razlike v vodnem potencialu med tlemi, rastlino in zrakom so pogonska sila za transport vode po rastlini. Voda namreč potuje v smeri nižjega vodnega potenciala, od korenin navzgor po celi rastlini (Boyer, 2005).

Rastline so v svojem okolju izpostavljene različnim stresom, ki jih definiramo kot kakršnokoli odstopanje od optimalnih razmer. Tako so stres za rastline poplava, suša, slanost, vročina, mraz, zmrzal (abiotiski stres), insekti, patogeni mikroorganizmi (biotski stres). Do pomanjkanja vode oziroma suše pri rastlinah pride, ko je izgubljanje vode s transpiracijo večje od privzema vode (Bray, 1997). Večina rastlin tekom življenskega cikla doživi pomanjkanje vode, ki je lahko posledica različnih stresnih dejavnikov (Ingram in Bartels, 1996). Tako imajo suša, nizke temperature in slanost enak učinek na celični ravni, zato je molekularni odziv rastlin na njih podoben (Brzin in Kidrič, 1995). Pomanjkanje vode je pri večini višjih rastlin običajna komponenta pri razvoju na izsušitev odpornih struktur, kot so semena, spore ali pelod (Ingram in Bartels, 1996). Na celičnem

nivoju pa se suša odraža v koncentriranju topljencev, spremembi prostornine celice in obliku membrane, porušenju gradientov vodnih potencialov, izgubi turgorja (posledica je ovelost rastlin), izgubi celovitosti membrane in denaturaciji proteinov. Rezultat popolne izgube proste vode je izsušitev ozziroma dehidracija (Bray, 1997).

2.1.1 Načini adaptacije rastlin na sušo

Rastline preživijo na določenem območju v spremenjenih, včasih izredno neugodnih razmerah okolja le, če imajo ustrezni vodni režim, ki predstavlja celoten proces gibanja vode v rastlini, in pozitivno vodno bilanco, ki je definirana kot odnos med prejeto in oddano vodo v rastlini. Na osnovi vodnega režima okolja rastline razdelimo v tri skupine, in sicer higrofite (rastejo na območjih, kjer je voda vedno prisotna), mezofite (rastejo v okolju s povprečno preskrbljenostjo z vodo, med katere sodi tudi večina kmetijsko pomembnih rastlin) in kserofite (rastejo v okolju, kjer je stalno pomanjkanje vode, medne spadajo tudi rastline, ki so sposobne oživitve) (Moore in sod., 1998).

Kot sem omenila v uvodu, poznamo rastline, ki same niso sposobne uravnavati svojega vodnega stanja ter torej spreminjačjo vsebnost vode v svojih tkivih v skladu z dinamiko vodnega režima okolja (Hieng in Kidrič, 2001). Te spadajo v skupino poikilohidričnih rastlin. Med homoiohidrične pa spadajo tiste rastline, ki lahko vzdržujejo razmeroma stabilno vlažnost svojih tkiv.

V prednosti so tiste rastlinske vrste, ki so v evoluciji razvile učinkovite fiziološke in biokemijske mehanizme odziva na sušo. Ti so zelo raznoliki, vendar se rastline v osnovi odzivajo na dva načina: ali tako, da se skušajo suši izogniti (hiter fenološki razvoj, podaljšanje dormance semen, razvojna plastičnost), ali pa tako, da pomanjkanje suše prenašajo oz. tolerirajo ter ohranijo fiziološko aktivnost tudi med znižanjem vodnega potenciala, ki je posledica suše (Hieng in Kidrič, 2001).

Toleranca na sušo je pogosta pri nižjih organizmih, toda le majhno število višjih rastlin je sposobnih preživeti popolno izsušitev svojih vegetativnih tkiv (Müller in sod., 1997). To

izjemno strategijo za preživetje v neugodnih sušnih obdobjih so tekom evolucije razvile že omenjene rastlinske vrste, ki jih poimenujemo kot rastline, ki prenesejo izsušitev (desiccation tolerant plants) oz. rastline, ki vstanejo od mrtvih (resurrection plants).

2.1.2 Molekularne osnove odziva rastlin na sušo

Poudariti je potrebno, da so vse rastline v večji ali manjši meri tolerantne na pomanjkanje vode. Pri vsaki rastlini se sproži nek začetni mehanizem, vendar v hudi suši vztrajajo in preživijo le nekatere rastlinske vrste. Omenjeno je že bilo, da poznamo na sušo tolerantne rastline, ki se borijo proti sušnemu stresu, toda če le-ta traja predolgo, rastlina propade. Dolgotrajna obdobja brez vode pa lahko preživijo rastline sposobne oživitve.

Na sušo tolerantne rastline so razvile mnoge mehanizme, ki jim pomagajo preživeti v razmerah, ko primanjuje vode. Nekatere nižje rastline, npr. mah *Tortula ruralis*, se izsušijo celo v eni uri in se zato poslužujejo predvsem popravljalnih mehanizmov med rehidracijo. V nasprotju pa se višje rastline, sposobne oživitve, poslužujejo predvsem indukcije mehanizmov, ki ščitijo celovitost celice med izgubljanjem vode (Oliver in Bewley, 1997). Da lahko rastline, sposobne oživitve, tolerirajo izsušitev, se morajo znati boriti proti trem glavnim oblikam stresa: mehaničnemu stresu (npr. krčenje membrane stran od celične stene), oksidativnemu stresu (povzročijo ga ROS) ter poškodbam makromolekul, kot so npr. DNA in proteini (Farrant, 2000; Alpert, 2006).

Sušni stres vodi do znatnih sprememb, tako v zvišanju ali znižanju ravni izražanja posameznih genov (Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Med obdobji vodnega primanjkljaja se v rastlini kot odziv na ta stres inducira veliko število genov. Mnoge od njih so v različnih rastlinskih vrstah že identificirali in opisali (Bray, 1997; Ingram in Bartels, 1996). Rezultat indukcije genov oz. izražanja informacije DNA v celici, je sinteza proteinov, ki so nosilci večine bioloških funkcij. Lahko so torej encimi, transportni, skladiščni, regulatorni, receptorski proteini, lahko imajo zaščitno vlogo itd. (Boyer, 2005). Pri identifikaciji induciranih genov moramo biti pozorni, če so le-ti res izraženi za

spodbuditev rastline, da se prilagodi na stres ali pa je sprememba v genski ekspresiji le rezultat celičnih poškodb nastalih med sušo (Bray, 2002).

Sledi opis zaznavanja in prenosa signala o pomanjkanju vode, kako rastlina ščiti celovitost celic ter kako popravlja morebitne nastale poškodbe, ki so posledice suše. Podani so tudi primeri genov, ki so imeli med dehidracijo povišano ekspresijo. Posebej so izpostavljeni geni rastlin, ki so sposobne oživitve.

2.1.2.1 Zaznavanje in prenos signala o pomanjkanju vode

Da pride do ekspresije genov kot odziv na sušni stres, je potrebno, da rastlina najprej zazna dražljaj ter obdela sprožene signale, kar pomeni, da jih ojača (pomnoži) in združi (Ingram in Bartels, 1996). Najmanj je znanega o zaznavanju sušnega stresa, ko se prvotne fizikalne spremembe, ki jih je povzročil primanjkljaj vode, pretvorijo v celični biokemični odziv. Možni fizikalni in tudi kemijski signali so znižanje vodnega potenciala, padec turgorja, spremembe prostornine celice ali površine membrane, vodne aktivnosti, vsebnosti topljencev, povezave med celično steno in membrano (Bray, 1997). Raziskave kvasovk, ki so služile kot model za preučevanje zaznav stresa in aktivacijo nadaljnjega prenosa stresnega signala, so pokazale, da topotni šok povzroči povečano fluidnost membran, kar kvasovke zaznajo in sprožijo odgovor na ta stres (Kiyosue in sod., 1994b). V mutantah kvasovk so tudi identificirali in izolirali gene za proteine, ki so vključeni v odgovor na zaznavanje osmotskega stresa. Zdi se, da bi rastline lahko imele podobne mehanizme zaznavanja (Bray, 1997).

Ko rastlina zazna stres, se mora signal prenesti po rastlini, le-ta pa se nanj odzove – lahko že v nekaj sekundah (sprememba fosforilacije proteinov) ali pa minutah oz. urah (izražanje določenih genov) (Bray, 1997). Ključno vlogo pri prenosu signala in posledično pri regulaciji izražanja genov naj bi imela abscizinska kislina (ABA), rastlinski hormon, ki deluje kot antistresni signal tudi pri ostalih abiotskih stresih. Akumulacija ABA torej vodi do sprememb v izražanju ABA-reguliranih genov (Bray, 2002). Poznani so nekateri genski elementi promotorjev iz rastline *Arabidopsis thaliana*: ABRE (element DNA odziven na

ABA-o), sestavljen iz zaporedja nukleotidov RYACGTGGYR (R označuje nukleotid s purinsko bazo, Y pa nukleotid s pirimidinsko bazo) in DRE (element DNA odziven na dehidracijo), sestavljen iz zaporedja nukleotidov TACCGACAT. Izražanje obeh elementov je pogojeno s pomanjkanjem vode in prisotnostjo ABA, poleg tega pa še s prisotnostjo nekaterih transkripcijskih faktorjev. Prisotnost določenega fragmenta DNA v genomu rastline pa še ne pomeni, da je ta nujno vpleten v proces regulacije izražanja specifičnega gena (Bray, 1997). Povečanje vsebnosti ABA v rastlinskih tkivih kot odziv na vodni primanjkljaj gre lahko na račun zvišanja biosinteze ali pa znižanega razpada ABA (Cutler in Krochko, 1999). Biosinteza ABA-e same poteka po terpenoidni poti, vanjo pa je vključenih veliko genov. Koncentracija tega rastlinskega hormona v tkivih zelo niha, med sušni stresom se v nekaj urah poviola tudi za 50-krat. Korenine, ki so v direktnem stiku s zemljo, so prve, ki zaznajo pomanjkanje vode, zato se ABA tam tudi najprej začne sintetizirati in se po ksilemu prevede do listov, kjer povzroči zapiranje listih rež in s tem tudi manjše izgubljanje vode. ABA pa kot odgovor na nizke vodne potenciale tudi pospeši rast korenin in inhibira rast poganjkov (Taiz in Zeiger, 2006).

Pri *Xerophyta viscosa*, rastlini sposobni oživitve, so kot posledico pomanjkanja vode dokazali poviola ekspresijo gena za fosfatazo, ki ima vlogo negativnega regulatorja signalne poti z ABA-o (Ingle in sod., 2007). Osnovni odziv na stres se tudi pri rastlinah kaže v spremenjenem primarnem metabolizmu. Tako so iz rastline, ki prenese izsušitev, *C. plantagineum*, izolirali gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo, ki ima med sušo in pod vplivom ABA-e poviola ekspresijo (Ingram in Bartels, 1996).

Ob vodnem stresu je pomembna povezava med abscizinsko kislino in etilenom, saj naj bi ABA regulirala sintezo etilena. Ob vodnem stresu etilen predvsem pospešuje staranje in odpadanje rastlinskih organov. To naj bi bila do določene mere obrambna funkcija, ker se s tem znižuje transpiracijska površina rastlin. Stresni etilen naj bi bil ob vodnem stresu udeležen pri zaščiti rastlin pred prehudimi posledicami stresnih pogojev v okolju (McMichael in sod., 1972; Virant-Klun, 1993).

Znano je tudi, da ob izpostavljenosti rastline različnim biotskim in abiotiskim stresom močno poraste sinteza etilena v rastlinskih tkivih. Le-ta je regulirana preko aktivnosti

encima ACC sintaze (ACC – aminonociklopropan karboksilna kislina). V stresnih pogojih, med katerimi je tudi vodni stres, močno porasteta sinteza in aktivnost tega encima. Posledica tega je povečana sinteza ACC in pretvorba ACC v etilen (Abeles in sod., 1992).

Za sušni stres naj bi bile značilne tudi nekatere proteaze, encimi, ki cepijo posamezne proteine, na primer določene encime, ki sodelujejo v prenosu signalov, ali pa take, ki katalizirajo spremembo spojin in celici pomagajo pri adaptaciji na dehidracijo oz. rehidracijo (Hieng in Kidrič, 2001).

2.1.2.2 Osmotsko prilagajanje ali osmoregulacija

Eden od načinov, kako se rastlina odziva na pomanjkanje vode, je tudi osmotsko prilagajanje oz. osmoregulacija, med katero pride do kopičenja osmotsko aktivnih substanc oz. osmotikov v celicah. Posledica je znižanje osmotskega potenciala, ki ugodno vpliva na vodni potencial celice (ga zniža). Tako se poveča razlika med vodnima potencialoma celice in zunanjega okolja, rezultat je povišano osmotsko prehajanje vode iz okolja v celico. S tem se ohranja celični turgor in omogoča nadaljnji potek metabolnih procesov (Bray, 1997). Anorganske osmotike zastopajo predvsem K^+ , Na^+ in Cl^- , med organskimi osmotiki pa so pomembni sladkorji (saharoza, maltoza...), proste aminokisline (npr. prolin), metilirane kvarterne amonijeve soli, poliolji in organske kisline. Značilnost organskih osmotikov je, da stabilizirajo proteinsko strukturo in s tem ščitijo encime pred povečano koncentracijo ionov (Živkovič in sod., 2005). Encimi metabolizma ogljikovih hidratov imajo pomembno vlogo pri toleranci izsušitve, saj namreč sladkorji pri mnogih organizmih predstavljajo zaščito med dehidracijo. Poznani so encimi, ki so vključeni v sintezo še nekaterih ostalih osmotskih topljencev, katerih vsebnost se med sušo ravno tako poviša, npr. $\delta\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat - sintetaza (biosinteza prolina), in betain aldehid - dehidrogenaza (biosinteza glicin betaina). Indukcija fosfoenolpiruvat - karboksilaze med sušo tudi kaže na pomembnost tega encima, ki omogoča fiksacijo ogljika z nizkimi izgubami vode, za rastline rastoče v sušnih pogojih (Ingram in Bartels, 1996).

Iz *C. plantagineum* so izolirali gena za saharoza-fosfatno - sintazo in saharozno - sintazo, pri *X. viscosa* pa gena za fosfopiruvat - hidratazo in alkoholdehidrogenazo, ki imajo povišano ekspresijo med sušnim stresom (Elster, 2004; Ingle in sod., 2007). V osnovi je njihova vloga, da se v celici zviša vsebnost sladkorjev.

Akumulacija proolina, tudi že omenjenega osmotika, korelira z rezistenco rastlin na vodni stres. Prolin verjetno predstavlja zalogo aminokislin med vodnim stresom, ki naj bi se porabile v sintezi proteinov ob rehidraciji. Od sušnem stresu se tudi poveča vsebnost glikoproteinov, bogatih s hidroksiprolinom v celičnih stenah, to pa ima za posledico večjo stabilnost celične stene in celice. Prolin pa naj bi bil tudi pomemben prekurzor za sintezo klorofila, takoj, ko stres preneha in se prične vzpostavljati prvotno fiziološko stanje (Virant-Klun, 1993).

Pri osmoregulaciji kot odzivu rastlin na pomanjkanje vode pa sodelujejo tudi transportni proteini, ionski kanalčki in prenašalci. Izolirali so nekaj genov, ki kodirajo polipeptide z značilnostmi ionskih kanalčkov (Ingram in Bartels, 1996). Akvaporini, družina membranskih proteinov, ki skrbi za transport vode skozi membrano, bi ravno tako lahko bili vključeni v odziv rastlin na sušo. Z znižanjem njihove fosforilacije, ki sicer poveča sposobnost kanalčkov za transport, bi med pomanjkanjem vode lahko upočasnili izhajanje vode iz celic (Bray, 1997).

2.1.2.3 Strukturne prilagoditve

Ko se zaradi pomanjkanja vode rast celic upočasni oz. ustavi, se poveča tudi ekspresija genov, ki kodirajo S-adenozilmethionin sintetazo, kar pomeni večjo lignifikacijo celičnih sten. To kaže, da se med sušo spreminjajo tudi sestava in fiziološke lastnosti sten rastlinskih celic (Robertson in Chandler, 1992). Vodni primanjkljaj ima pričakovano velik vpliv tudi na celične membrane. Običajen odziv rastlin je znižanje vsebnosti lipidov, ki ga lahko razlagamo kot posledico zmanjšanja površine celične membrane, spremenijo pa se tudi interakcije med lipidi in membranskimi proteini (Navari-Izzo in Rascio, 1999; Hernandez in Cooke, 1997). Sestava in organizacija lipidov plazemske membrane iga

pomembno vlogo pri intracelularnem metabolizmu. Veliko ključnih celičnih aktivnosti, se začne v membrani, katere struktura in funkcija se hitro spremenita zaradi vodnega stresa, to pa vodi tudi do povečane permeabilnosti. Celice se temu upirajo tako, da med sušnim stresom povečajo rigidnost (neprožnost, manjšo prehodnost) membrane. To lahko dosežejo tako, da jih obogatijo s prostimi steroli, hkrati pa s povišanjem vsebnosti nasičenih maščobnih kislin, znižajo membransko fluidnost (zniža se transport skozi membrano). Raziskave so pokazale splošno tendenco dehidriranih rastlin prilagoditi njihove membrane spremenjenim okoljskim razmeram ter čimprejšnjo obnovitev sestave lipidov in ostalih parametrov v fazi rehidracije (Quartacci in sod., 2002). Za preživetje rastlin, sposobnih oživitve, je ključnega pomena, da se po dehidraciji membranam hitro povrne njihova organizacija in funkcionalnost.

C. plantagineum, rastlina, ki prenese izsušitev, je med dehidracijo podvržena morfološkim spremembam kloroplastov. Toda med rehidracijo se raven fotosinteze hitro povrne na običajno raven, pri tem pa verjetno sodeluje izoliran gen za protein dsp-22 s povečanim izražanjem med sušo, ki veže pigmente ali pa pomaga ohraniti fotosintetske strukture (Ingram in Bartels, 1996). Z ohranjanjem fotosintetske aktivnosti so povezani tudi geni za fotosintetske proteine, za katere so odkrili, da imajo različno izražanje pri homoioklorofilni *C. plantagineum* in poikiloclorofilni rastlini sposobni oživitve *X. viscosa* (Ingle in sod., 2007).

2.1.2.4 Zaščita celičnih struktur

LEA proteini

LEA proteini (Late-Embryogenesis-Abundant proteins) so skupina heterogenih proteinov, ki so jih našli v rastlinah, nato pa še v ostalih organizmih in jih glede na njihovo podobnost aminokislinskih sekvenc razvrščamo v več skupin. Predvidevajo, da imajo pomembno vlogo pri odzivu na stres, tako pri algah, bakterijah, kvasovkah in seveda rastlinah. V višjih rastlinah se LEA proteini izražajo v različnih stadijih pozne embriogeneze pri embrijih semen (kopičijo se v embriju), in pri različnih stresih, vključno s sušo v vegetativnih tkivih. V splošnem je torej izražanje teh proteinov povezano s pomanjkanjem vode v

rastlinskih tkivih in dehidracijo v semenih, kopičijo pa se v citoplazmi in plastidih. Kljub intenzivnim raziskavam njihova biokemična funkcija še ni v celoti pojasnjena (Ingram in Bartels, 1996; Singh in sod., 2005).

LEA proteini so povezani še z dvema skupinama proteinov, in sicer RAB (responsive to ABA), ki smo jih prej že omenili, in DHN (dehydrin) proteini. Ti proteini se kopičijo v različnih tkivih kot odziv rastlin na dehidracijo, npr. pri razvoju embrijev in peloda, v vegetativnih tkivih, ki so izpostavljeni sušnemu stresu, vključno s popolno izsušitvijo pri rastlinah sposobnih oživitve. LEA, RAB in DHN proteini so zaradi svoje aminokislinske sestave izrazito hidrofilni in zato posledično vodotopni, bazični, bogati z glicinom in lizinom, imajo malo hidrofobnih aminokislinskih ostankov in so temperaturno stabilni. Na podlagi teh značilnosti so predlagali, da je njihova funkcija predvsem zaščita membran in proteinov pred pomanjkanjem vode (Dure in sod., 1989). V takih pogojih naj bi tesno vezali vodo, tvorili hidrofilne interakcije oz. obdajali aminokislinske ostanke, ki so na površini proteinov ter preprečevali kristalizacijo celičnih komponent (podobne posledice imajo tudi sladkorji). Eden od teh proteinov je povzročil povečano osmotoleranco v transgeni kvasovki (Swire-Clark in Marcotte, 1999). LEA proteine ter tudi njim po fiziikalno-kemijskih lastnostih podobne proteine so odkrili v rastlini, sposobni oživitve *C. plantagineum* (Ditzer in Bartels, 2006; Rodrigo in sod., 2004; Taiz in Zeiger, 2006).

Sladkorji

Sladkorji, ki smo jih že omenili pri osmoregulaciji, imajo tudi zaščitno vlogo. Saharoza, ki se kopiči npr. v listih *X. viscosa* in *R. serbica*, ščiti membrane in proteine namesto vode. To ji omogoča veliko število OH-skupin, s katerimi zavaruje morebitne izpostavljene nepolarne dele razvitih proteinov. Saharoza povzroči vitrifikacijo namesto kristalizacije sladkorja in tako ustvari nekakšen »film« okrog proteinskih struktur (Ingle in sod., 2007; Müller in sod., 1997).

2.1.2.5 Mehanizmi za popravilo škode

Veliko proteinov je vključenih v omejevanje škode ali v odstranjevanje toksičnih spojin, ki nastajajo v celicah zaradi sušnega stresa. Mednje spadajo npr. ubikvitin, šaperoni in proteaze, ki skrbijo bodisi za ponovno pravilno zvitje proteina ali pa za njihovo razgradnjo, če so nepopravljivo poškodovani (Bray, 1997). Med sušnim stresom namreč lahko pride do sprememb aminokislinskih ostankov v proteinih v kemijskih procesih deaminacije, izomerizacije ali oksidacije, zato je zelo verjetno, da se poviša ekspresija encimov, ki pomagajo pri popravilu proteinov. Gene s podobno sekvenco kot jo imajo proteaze, in se inducirajo med sušo, so že izolirali iz graha in *A. thaliana*. Njihova naloga naj bi bila razgradnja močno poškodovanih proteinov. V *A. thaliana* so prav tako našli zvišane vsebnosti mRNA, ki kodira ubikvitin (Kiyosue in sod., 1994a). Gre za protein, ki ima zelo dobro ohranljeno aminokislinsko sekvenco in je zato podoben v različnih vrstah. Ubikvitin med drugim v celici sodeluje pri razgradnji proteinov. Med sušo induciranimi geni so našli tudi gene s sekvencami podobnimi proteinom topotnega šoka. Verjetno gre za šaperone, ki pomagajo proteinu, da se po denaturaciji ali nepravilnem zvitju, ponovno zvije v nativno konformacijo (Ingram in Bartels, 1996).

Pri rastlinah, izpostavljenih kakršnikoli obliki stresa, vključno s sušo, je povečana produkcija reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Le-te na biokemijskem nivoju povzročijo oksidativne poškodbe ogljikovih hidratov in lipidov ter razgradnjo proteinov in klorofilov. Proti negativnim učinkom ROS se rastline branijo z antioksidanti nizke molekulske mase (askorbat, glutation) in zaščitnimi encimi (superoksidna dismutaza, peroksidaze, glutation reduktaza...), ki katalizirajo znižanje ROS v celici. To so torej snovi, ki preprečijo oksidacijo in s tem tvorbo škodljivih prostih radikalov, ki jih spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije (Sgherri in sod., 2004; Luo in sod., 1991). Askorbinsko-glutationski cikel je glavna antioksidacijska pot v plastidih, saj se z njegovo pomočjo tam odstranjujejo nastali reaktivni prosti radikali kisika (Hieng in Kidrič, 2001). Varovalni vpliv pred oksidacijskim stresom imajo tudi fenoli, ki zaustavijo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom (Abram, 2000).

Pri rastlini *X. viscosa* so našli tri proteine, ki imajo verjetno zaščitno vlogo proti oksidativnim poškodbam. Omenjeni proteini s spremenjenim izražanjem so: 2-Cya-Prx, GDP-manoza-3',5'-epimeraza in askorbat peroksidaza (Ingle in sod., 2007).

Do sedaj smo največkrat kot odziv na sušni stres omenjali zvišano izražanje številnih genov. Ni pa dovolj, da se geni samo izrazijo, pomembno je tudi pravilno nadaljnje procesiranje mRNA, stabilnost transkripta, učinkovitost translacije in posttranslacijskih modifikacij proteinov. Pri koruzi *pMAH9* pa tudi pri rastlini, sposobni oživitve, *X. viscosa*, so našli protein, ki ima med sušo povišano izražanje, in ima karakteristike podobne proteinom, ki se vežejo na mRNA. Na podlagi tega sklepajo, da bi lahko imel ta protein vlogo pri selektivni stabilizaciji molekul mRNA. Nekatere študije pa tudi potrjujejo hipotezo, da se v rastlinah, sposobnih oživitve, med dehidracijo kopijo molekule mRNA in se med rehidracijo samo še prevedejo. Zaradi tega bi lahko prišlo do velikih razlik med vsebnostjo mRNA in proteinov v dehidriranih listih. Druga kontrolna točka so posttranslacijske modifikacije že sintetiziranih proteinov, kjer fosforilacija predstavlja ključni mehanizem. (Ingram in Bartels, 1996; Ingle in sod., 2007).

Potrebno pa je omeniti, da kljub večini pozitivno izraženih genov, odziv na sušo vključuje tudi nekaj genov, z znižanim izražanjem. V listih fižola *Phaseolus vulgaris* so dokazali kar nekaj genov z znižanim izražanjem med sušnim stresom (Kavar in sod., 2007). Študije *C. plantagineum* pa so na primer razkrile, da imajo nekateri tudi že prej omenjeni geni za proteine, vključeni v fotosintezo, znižano izražanje med dehidracijo in da bi njihova vloga lahko bila v redukciji fotooksidativnega stresa (Ingram in Bartels, 1996).

2.1.3 Homoiohidrične rastline

Homoiohidrične rastline so skupina rastlin, za katere je značilno, da so sposobne uravnavati vsebnost vode v tkivih. To jim omogoča, da so bolj ali manj neodvisne od vlažnosti okolja. Za celice teh rastlin je značilna velika centralna vakuola, ki pomaga uravnovesiti spremembe v vlažnosti okolja. V krajsih obdobjih omejene preskrbe z vodo, se protoplazma nasičuje z vodo iz vodne raztopne vakuole. Vendar je ta velika centralna

vakuola hkrati tudi prepreka za reverzibilne spremembe celične strukture med procesi dehidracije in rehidracije. Celica zaradi nje ni dovolj prožna in tako ne vzdrži sprememb zaradi krčenja pri dehidraciji in ponovnega širjenja med rehidracijo. Za te rastline je tudi značilna prisotnost kutikule, ki omejuje izparevanje vode, ter močan koreninski sistem (Stevanović in Janković, 2001).

2.1.3.1 *Saintpaulia* sp.

Afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) pripada družini gesnerjevk (Gesneriaceae) in ni, kljub imenu, prav nič v sorodu z vijolicami. Prihaja iz Tanzanije in Kenije, so pa jo v več kot 100 letih vzgajanja v okrasne namene zelo spremenili. Še vedno razvijajo mnogo novih sort, bogato cvetočih in zelo različnih barv, v svoji domovini so bile le modro cvetoče. Cvetijo skozi vse leto, zato so priljubljene okrasne sobne rastline. Afriške vijolice imajo pritlične, skoraj vodoravno štrleče, dolgopečljate, temno zelene, mesnate liste, ki so ovalne ali srčaste oblike, so dlakavi, s poudarjenimi listnimi režami in sestavlajo rozeto, ki v premeru meri od 3 do 30 cm. Primerno okolje za rast afriških vijolic je zračno in senčno, prisotna precejšnja stopnja vlage, nikoli ne smejo biti izpostavljene neposrednemu soncu. Razmnožujemo jih s semen, listnimi potaknjenci ali delitvijo matični rastlin (Longman, 1986).

V literaturi smo zasledili le rezultate raziskave vpliva pomanjkanja vode na proteolitično aktivnost v listih afriške vijolice. Proteaze, skupina hidrolitičnih encimov, imajo pomembno vlogo tako pri razvoju rastlin kot v mnogih fizioloških in celičnih procesih, saj je selektivna razgradnja proteinov vključena v ves življenjski cikel rastlin. Pri afriških vijolicah, ki je bile izpostavljene suši, so v primerjavi z redno zalivanimi rastlinami opazili nižjo proteazno aktivnost, le-te pa v listih popolnoma suhe afriške vijolice niso zaznali (Mužerlin, 2009).

2.1.4 Poikilohidrične rastline

Poikilohidrične rastline so skupina rastlin, ki spreminjajo vsebnost vode v tkivih v skladu z razgibanostjo vodnega režima okolja, saj same niso sposobne uravnavati vodnega stanja. To pomeni, da v vlažnem okolju sprejemajo vodo s celotno površino, kapilarnim sistemom in nabrekanjem ter so biološko aktivne, dokler je prisotna voda. Z znižanjem vlažnosti v okolju te rastline znižajo svojo metabolno aktivnost in preidejo v stanje mirovanja oz. anabiozo, ki je reverzibilno stanje. Dehidracija tkiv teh rastlin ne pomeni njihovega propada, temveč le umik pred sušo in ekstremno neugodnimi pogojimi v okolju. V takem stanju lahko ostanejo več mesecov ali celo let. Ko se zviša vlažnost v okolju, se vsi metabolni procesi ponovno obnovijo in vzpostavijo. Tako lahko v okolju preživijo več zaporednih ciklov dehidracije – rehidracije. Zaradi tako posebnih lastnosti, ki jih ima v vsej svetovni flori le malo vrst višjih rastlin, bolj pa so zastopane pri algah, lišajih in mahovih, poikilohidrične rastline imenujemo tudi oživitve sposobne. Rastejo počasi in imajo majhno razmnoževalno sposobnost. Njihovo tkivo sestavljajo majhne celice z gosto citoplazmo z velikim številom mitohondrijev in peroksisomov ter mnogimi majhnimi vakuolami, v katerih se kopijo taninske snovi. Razdelimo jih lahko v dve kategoriji: tiste, ki hitro izenačujejo notranjo vsebnost vode z vodnim potencialom okolja (prave poikilohidrične rastline, večina med njimi spada med nižje rastline) in ki ob rehidraciji izjemno hitro preidejo v aktivno življenje, in tiste, ki imajo mehanizme za zadrževanje in nadzorovanje izgubljanja vode (modificirane poikilohidrične rastline, ki jih najdemo med višjimi rastlinami, a ne med golosemenkami) in zato potrebujejo več časa, da preidejo v suho oz. ponovno v rehidrirano stanje (Stevanović in Janković, 2001).

2.1.4.1 *Ramonda* sp.

Ramonde spadajo v zelo majhno skupino modificiranih poikilohidričnih kritosemenk, ki uspevajo na severni polobli. Rod *Ramonda* sestavljajo *Ramonda serbica*, *Ramonda nathaliae* in *Ramonda myconi*. Večino, od skupno 60 vrst oživitve sposobnih kritosemenk v vsej svetovni flori, najdemo na južni polobli. Med njimi je *Craterostigma plantagineum* daleč najbolj raziskana vrsta. Ramonde spadajo v subtropsko družino gesnerjevk

(Gesneriaceae). So homoioklorofilne rastline, saj med izsušitvijo lahko ohranijo celo do 90% pigmentov, vključno s klorofilom, zato so njihovi listi tudi med dehidracijo še vedno vidno zeleni (Dražić in sod., 1999).

Ramonda nathaliae in *Ramonda myconi* sta diploidni vrsti (48 kromosomov), *Ramonda serbica* pa je heksaploid (144 kromosomov) (Siljak-Yakovlev in sod., 2007). Ramonde so večletne rastline. Nazobčani, z dlačicami porasli listi se prilegajo k podlagi in oblikujejo prizemno rozeto, ki v premeru meri od 2 do 15 cm. Sestavlja jo 10-30 listov, dolgih 3-5 cm in dolgih 1-3 cm. Po obliku so eliptoajčasti do širokoajčasti. Imajo 1-3, včasih celo do 5 cvetov rožnatovijoličaste barve. *R. sebica*, *R. nathaliae* ter kultivirana *R. myconi* cvetijo aprila in maja, nekultivirana *R. myconi* pa od junija do avgusta (Hieng in Kidrič, 2001).

Ramonda serbica je endemična vrsta, ki se je kot terciarni relikt obdržala na Balkanskem polotoku. Razširjena je v Albaniji, zahodni Makedoniji, južni in severovzhodni Črni gori, Metohiji, Epiru v Grčiji, severovzhodni Bolgariji ter v enklavah v Srbiji, predvsem v okolici Niša (Hieng in Kidrič, 2001). Rastejo izključno na severni strani apnenčastih sotesk, najdemo jih tudi ob robovih gozdov, tudi do 2000 metrov nadmorske višine. Njihov življenjski prostor na skalnatih pobočjih je zaznamovan z ostrimi okoljskimi razmerami – visoko sevanje in temperature ter hudo pomanjkanje vode, ki lahko traja več mesecov (Stevanović in sod., 1997).

Ramonde so z leti postale pomemben model v fizioloških študijah in so veliko prispevale k dosedanjemu razumevanju mehanizmov tolerance na sušo (Toth in sod., 2004). Kot smo že omenili ramonde spadajo med oživitve sposobne rastline, ki so zmožne preživeti popolno dehidracijo protoplazme brez trajnih poškodb. Ko se zaradi ostrih pogojev v njenem okolju zniža vsebnost vode, postopno ovenijo in padejo v anabiozo. V treh tednih brez vode se relativna vsebnost vode (RVV) v listih ramond zniža celo na manj kot 4 %, v enem tednu rehidracije pa listi ponovno ozelenijo, rastlina »oživi«, RVV naraste na več kot 93 %. Začetne spremembe teh rastlin zaradi suše so podobne odzivu netolerantnih rastlin (Gaff, 1989), vendar le-te po daljšem pomanjkanju vode utrpijo strukturne in funkcionalne nereverzibilne spremembe, medtem ko oživitve sposobne rastline zapadejo v anabiozo,

vendar ohranijo sposobnost nadaljnjih bioloških aktivnosti med rehidracijo (Stevanović in sod., 1997).

Kakšne prilagoditve so torej razvile ramonde, da lahko preživijo ekstremno sušo? Najprej se osredotočimo na celično membrano. Sestava in organizacija lipidnega dvosloja, ki poleg proteinov sestavlja membrano, namreč ključno vpliva na znotrajcelični metabolizem (Quartacci in sod., 2002). Celica se ohranja pri življenju, dokler more ohranjati stabilne notranje razmere, ki se večinoma močno razlikujejo od razmer v okolju. Vsebnost lipidov v listih ramond je v primerjavi z ostalimi kritosemenkami nizka, zato imajo njihove celice posledično manj membranskega materiala. V izsušenih listih je drugačna sestava lipidov, npr. v galaktolipidih je nizka vsebnost linolenske kisline, ki je nenasičena maščobna kislina. Detektirali so tudi povišane vsebnosti prostih sterolov, ki pripomorejo k povečani rigidnosti celic (Quartacci in sod., 2002). Omenili smo že, da je membrana z nižjo vsebnostjo nenasičenih oz. višjo vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin bolj stabilna, posledično pa manj prehodna, permeabilna. Dobljeni rezultati torej kažejo, da ramonde stabilizirajo strukturo membran na račun znižane fluidnosti in posledično tudi metabolne aktivnosti (Stevanović in sod., 1991). Med dehidracijo je redukcija listnih lipidov drastična, sinteza med rehidracijo pa izredno hitra (Hieng in Kidrič, 2001), saj je ohrjanje celovitosti membrane in njena učinkovita rekonstrukcija prvi pogoj za celično preživetje (Stevanović in sod., 1991). S tem se skladajo tudi rezultati raziskav, kjer so dokazali, da je izhajanje topljencev skozi celično membrano iz oživitve sposobnih rastlin, vključno z ramondami, neprimerno manjše kot pri občutljivih ali rezistentnih homoiohidričnih rastlinah, npr. pri afriški vijolici (Stevanović in sod., 1997).

Toleranco izsušitve pri ramondah lahko povežemo tudi s kopičenjem saharoze v listih, ki zaščiti membrane in proteine. Med dehidracijo se njena vsebnost poveča iz 2 % na 10 % suhe teže na račun razgradnje škroba, rafinoze ter *de novo* sinteze ogljikovih hidratov. Akumulirana saharozna na začetku rehidracije se hitro metabolizira. Zaščitna vloga saharoze je povezana z rafinozo, sladkorjem, ki je tudi prisoten v listih ramond. Med dehidracijo se vsebnost rafinoze sicer zniža, vendar je še vedno zadostna, da preprečuje kristalizacijo saharoze (Müller in sod., 1997). Le-ta pa skupaj s kopičenimi anorganskimi ioni sodeluje tudi pri osmoregulaciji (Živković in sod., 2005). V dehidriranih listih ramond

se povišajo vsebnosti K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ter še nekaterih anionov oz. kationov. Med rehidracijo vrednosti padejo, v prvi fazi rehidracije ostane visoka oz. se še dodatno poviša le vsebnost K^+ , kar kaže na njegovo pomembno vlogo pri odpiranju listnih rež in posledično večjem privzemu CO_2 . Med osmolite sodi tudi aminokislina prolin, ki pa pri ramondah nima vloge pri osmotski regulaciji, saj ga je v izsušenih listih prisotnega manj kot v kontrolnih, ves čas zalivanih (Živkovič in sod., 2005).

Med učinkovite zaščitne mehanizme ramond v dehidriranem stanju sodijo tudi zvišane vrednosti zeaksantina ter reduciranega askorbata in glutationa (Sgherri in sod., 2004). V prvih 13 dneh suše tkiva rastline *R. serbica* producirajo veliko ROS, kar je sicer običajen odziv rastlin na stres, v stanju anabioze pa se zniža. Poškodbam zaradi ROS se izognejo s povišano sintezo antioksidativnih substanc, kamor sodita tudi askorbat in glutation, ki metabolizirata vodikov peroksid v askorbinsko-glutationskem ciklu. Nižja oksidacija antoksidantov v anabiozi vpliva na povišanje oz. akumulacijo njihove reducirane oblike, ki predstavlja rezervo, ki rastlini *R. serbica* omogoča tolerirati oksidativne poškodbe med dehidracijo, še bolj pa med rehidracijo, ko se morajo popraviti med sušo povzročene poškodbe. Pri ramondah v odzivu na antioksidativni stres sodelujejo tudi fenolne kisline (Sgherri in sod., 2004). Njihova vsebnost v listih med dehidracijo močno pade, ter se že v prvi stopnji rehidracije zelo poviša. Vsebnost fenolnih kislin pri rastlini *R. serbica* je nenavadno visoka v primerjavi z ostalimi višjimi rastlinami. Padec skupnih fenolnih kislin kaže na njihovo pomembno vlogo proti oksidaciji, namreč kot substrat za peroksidaze, ki odstranjujejo ROS (Sgherri in sod., 2004). Še eden od zaščitnih mehanizmov ramond pa je tudi že prej omenjeni zeaksatin. Gre za karatenoid, rastlinski pigment, ki ščiti liste pred fotoinhibicijo (Šircelj, 2008) – zmanjšanjem fotosintetske aktivnosti zaradi negativnih vplivov premočne svetlobe na fotosintetski aparat, ki so mu ramonde v gorskem svetu še bolj izpostavljene. Čeprav je v stanju anabioze prisotnega le malo zeaksantina, verjetno vseeno pomembno prispeva k odvajanju ekscitacijske energije v obliki toplotne med rehidracijo (Augusti in sod., 2001). Proti fotoinhibiciji se ramonde upirajo tudi z zvitjem dehidriranih listov, s čimer preprečijo vpliv svetlobe na klorofil (Sherwin in Farrant, 1998).

Kot smo že omenili, so ramonde homoioklorofilne rastline, saj izgubijo le približno 20% klorofila med dehidracijo. Prisotnost vode inducira ponovno sintezo klorofila, kar kaže, da

je voda osnovni faktor za rekonstrukcijo ultrastrukture fotosintetskega aparata in ne svetloba, ki pa spodbudi k popolni povrnitvi njegovih fizioloških funkcij. Rehidracija rastline *R. serbica* je v temi potekala celo hitreje kot na svetlobi, kar bi lahko bila evolucijska, strukturna in fiziološka prilagoditev te rastline na rastišča v stalni senci (Dražić in sod., 1999; Markovska in sod., 1995).

Zanimivi pa so tudi podatki o raziskavah proteaz, encimov, ki cepijo proteine. V nasprotju z afriško vijolico, pri kateri so pod vplivom pomanjkanja vode v listih zaznali nižjo aktivnost proteaz kot v kontrolnih listih, v suhih pa je sploh niso zaznali, so pri ramondi zaznali visoko proteazno aktivnost v izsušenih listih oz. jih v kontrolnih listih sploh niso zaznali. (Mužerlin, 2009). Ti rezultati kažejo, da so serinske endopeptidaze in serinske aminopeptidaze, ki so jih odkrili v listih ramonde, pomembne za specifičen način preživetja izsušitve v anabiozi in za oživitev ob ponovni vzpostavitvi stanja zadovoljive oskrbe z vodo. Opazili so tudi, da se v ekstraktih listov stresiranih rastlin količina topnih proteinov poveča v primerjavi z ekstrakti kontrolnih rastlin. Proteaze, ki se sintetizirajo pred izsušitvijo in ostanejo aktivne v anabiozi, lahko v rehidrirani rastlini sodelujejo v razgradnji poškodovanih proteinov in proteinov, ki so potrebni v izsušenem listu in ne pa več v rehidriranem. Ne gre zanemariti tudi omejeno proteolizo oz. cepitev specifičnih peptidnih vezi in posledično aktivacijo encimov, potrebnih za specifičen odziv ramonde. Dejstvo, da izsušeni listi niso bili poškodovani, lahko pomeni, da so proteaze bile inhibirane oz. blokirane z zaščitnimi proteini ali ogljikovimi hidrati (Mužerlin, 2009).

2.2 PROTEOMIKA

Proteini so najkompleksnejše in najštevilčnejše organske molekule v celicah. Predstavljajo več kot polovico suhe mase celice (Stušek in sod., 1998) in so nosilci večine bioloških funkcij. Da bi razumeli, kako celice delujejo, je potrebno raziskovati, kateri proteini so prisotni, kje se nahajajo, kako interagirajo z drugimi molekulami in katere funkcije opravljajo tekom razvoja ali v različnih stresnih oz. bolezenskih stanjih. Pojem proteom zajema celokupen nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu v določenem trenutku (Križaj, 2008). Celotnega proteoma pa dejansko nikoli ne moremo analizirati, ker

so proteini prisotni v ogromnem razponu koncentracij, uporabljeni metode pa imajo neko spodnjo mejo detekcije (Mandelc, 2008). Za razliko od genoma, ki je razmeroma stabilen, je celični proteom podvržen neprestanim spremembam – kot odziv na spremembe v zunanjem in notranjem celičnem okolju. Običajno nas zanimajo razlike med normalnim in patološkim stanjem oz. stanjem, ko celice niso izpostavljene optimalnim pogojem (Komel in sod., 2008).

2.2.1 Priprava bioloških vzorcev za proteomske analize

V proteomskih raziskavah sta prvi dve fazi najpomembnejši. To sta zasnova eksperimenta in priprava vzorca. Zasnova eksperimenta obsega natančno opredelitev, in sicer, kaj nas zanima, ter določitev ustrezne števila ponovitev, da zadostimo zahtevam statistike. Stremimo k temu, da se pogoji preiskovane, vzorčne skupine razlikujejo od kontrolne samo v pogoju, ki nas zanima (npr. prisotnost/odsotnost neke snovi, temperatura, pomanjkanje vode...) (Mandelc, 2008).

Pri delu z biološkim materialom se srečujemo z veliko raznolikostjo vzorcev in širokim razponom izražanja proteinov v celicah, zato priprava reprezentativnega vzorca predstavlja tehnični in metodološki izviv (Hrovat in Vrecl, 2008). Ko določimo, kaj bo naš izhodni material za nadaljnje analize, izberemo še ustrezen način ekstrakcije proteinov. Rastline imajo, v primerjavi z mikroorganizmi in živalskim tkivom relativno nizko vsebnost proteinov glede na volumen oz. suho maso. Želimo si, da v vzorec dobimo čim več proteinov, da so v topni in denaturirani obliki, da prekinemo vse obstoječe interakcije, reduciramo disulfidne vezi, preprečimo razgradnjo proteinov, se znebimo vseh substanc, ki bi motile ločevanje proteinov (Mandelc, 2008). Teh snovi je v rastlinskih ekstraktih veliko, npr. polifenoli, ogljikovi hidrati, pigmenti, terpeni, inhibitorni ioni. Za odstranjevanje motečih substanc, večina protokolov za izolacijo proteinov iz rastlinskega tkiva vključuje precipitacijo proteinov, s katero proteine oborimo, ostale moteče molekule pa ostanejo v raztopini. Najpogosteje je uporabljeni precipitacija s triklorocetno kislino (TCA) ali TCA v acetonu (Carpentier in sod., 2005).

2.2.2 Dvodimenzionalna gelska elektroforeza

Dvodimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE) je metoda za ločevanje proteinov. V prvi dimenziji jih ločujemo glede na njihovo izoeletrično točko (pI) z izoelektričnim fokusiranjem (IEF), v drugi dimenziji pa glede na njihovo molekulske maso z poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). Za kako učinkovito metodo gre, nam pove podatek, da so na enem gelu uspeli ločiti celo do 10000 različnih proteinov, kar sovпадa z oceno števila izraženih proteinov v evkariontski celici. Z uporabo širokega razpona pH gradiента (3-12) pri IEF lahko naredimo vpogled v celotne celične ekstrakte. Kljub temu pa lahko hitro izgubimo hidrofobne, zelo velike ali majhne, zelo kisle ali bazične proteine ali pa tistih, ki jih je v celici zelo malo, sploh ne zaznamo. Z uporabo ozkega pH gradienta z razponom 1-1,5 pH enot dobimo podrobnejši vpogled v celični ekstrakt in ločimo tudi manj zastopane proteine. Kljub visoki zmogljivosti ločevanja proteinov z 2-DE, je včasih potrebno razdeliti proteom nekega vzorca na subproteome (Cellini in sod., 2004; Görg in sod., 1999).

Po končani ločitvi proteine vizualiziramo z ustreznimi barvili. Visoko občutljivost imajo barvila fluorofori, npr. barvilo Sypro Ruby. S pomočjo ustreznih računalniških programov določimo lise oz. proteine, ki se diferencialno izražajo in so zato zanimivi za identifikacijo (Komel in sod., 2008).

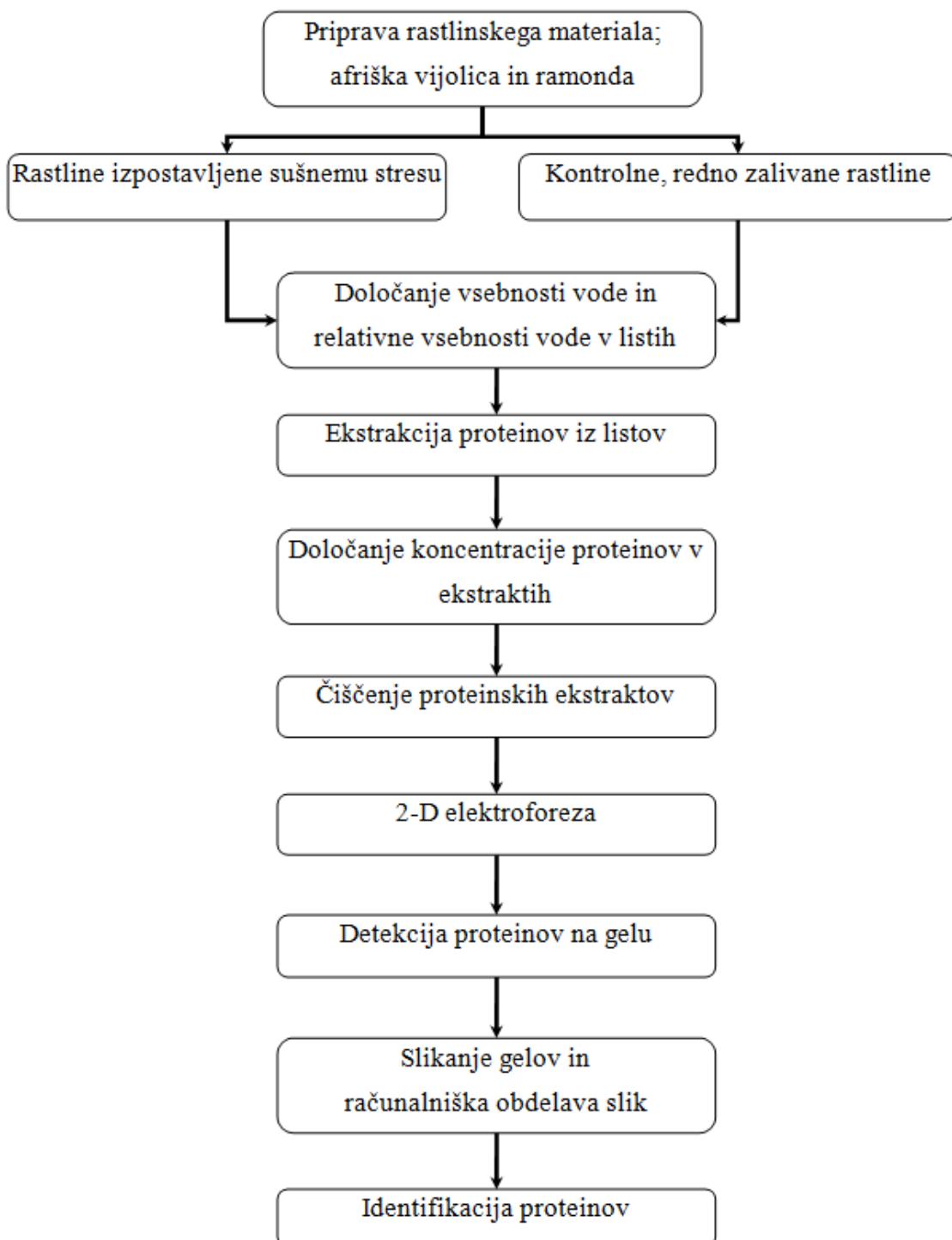
2.2.3 Identifikacija proteinov

Glavna metoda za identifikacijo proteinov je masna spektrometrija (MS). Povezava 2-DE in MS je omogočila prve obsežnejše analize kompleksnih proteinskih vzorcev. Meritve se izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi. Glavni sestavni deli masnega spektrometra so ionizator, masni analizator in detektor. V ionizatorju se tvorijo ioni, v masnem analizatorju se ioni ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z) – torej vsi analizatorji ne izmerijo dejanske mase peptida, detektorji pa izmerijo ionski tok pri posamezni vrednosti m/z . Za peptide sta primerna načina ionizacije MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) in ESI (electrospray ionization). Rezultat meritve,

masni spekter, je prikaz absolutne ali relativne intenzitete ionskega toka v odvisnosti od m/z. Temu sledi zelo pomemben korak, in sicer interpretacija masnega spektra (Križaj, 2008). V proteomiki se izvajata dve obliki MS: peptidno mapiranje in tandemmska MS. Metoda peptidnega mapiranja je uporabna le, če je znano genomsko zaporedje preiskovanega organizma (Mandelc, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 1: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Rastlinski material

Vpliv sušnega stresa na ravni proteoma smo preučevali na afriški vijolici *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. in ramondi *Ramonda serbica* Panč., ki pripadata družini Gesneriaceae. Afriška vijolica je homoiohidrična rastlina, ramonda pa je poikilohidrična rastlina. Rastline afriške vijolice smo vzgojili na Odseku za biotehnologijo Instituta »Jožef Stefan« iz ene rastline komercialnega vira najprej s pomočjo potaknjencev, potem pa z delitvijo matičnih rastlin, ko so na njih zrasli poganjki. Ramondo smo dobili v Botaničnem vrtu Fakultete za biologijo Univerze v Beogradu, kamor so jo prenesli iz njenega naravnega okolja v jugovzhodnem predelu Srbije. Cele rastline smo skupaj z zemljo, v kateri so rasle, prepeljali v Ljubljano in jih dali v isto rastno komoro kot afriške vijolice. Rastlinski material so predstavljali v tekočem dušiku homogenizirani in na -80 °C shranjeni listi obeh rastlinskih vrst.

3.2.2 Reagenti in raztopine

Priprava ekstraktov iz listov afriške vijolice

- pufer za ekstrakcijo:

Preglednica 1: Sestava pufra za ekstrakcijo proteinov

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	1 g	4 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
DTT (Sigma)	0,25 g	1 % (w/v)
Inhibitor proteaz (Complete mini Roche Diagnostic)	1 tableta	
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

- Polivinilpirolidon (PVP)

Določanje koncentracije proteinov v celičnih ekstraktih listov

- Bradfordov reagent (BioRad Protein Assay)
- Goveji serumski albumin (Sigma)

Čiščenje proteinskih ekstraktov

- 2-D Clean Up Kit (GE Healthcare)

Dvodimenzionalna elektroforeza

Prva dimenzija:

- Trakovi z imobiliziranim pH gradientom od pH 3 – 10, dolžine 13 cm (GE Healthcare)
- Mineralno olje (Sigma)
- Raztopina za rehidracijo trakov:

Preglednica 2: Sestava raztopine za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

Pripravljeno raztopino za rehidracijo trakov alikvotiramo po 2 mL. Preden ga dodamo očiščenim ekstraktom osnovno sestavino odtajamo na sobni temperaturi in dodamo 0,0200 g DTT/2 mL raztopine, da je koncentracija DTT 65 mM.

Druga dimenzija:

- ločilni gel:

Preglednica 3: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm za SDS-PAGE

Sestavine	Količina (za 4 gele)
Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30%/0,8%)	31,4 mL
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	19,6 mL
10 % (w/v) raztopina SDS	0,8 mL
ddH ₂ O	26,0 mL
10% (w/v) raztopina APS	390 µL
TEMED	26 µL

Raztopino (akrilamid/bisakrilamid, raztopina Tris-HCl, raztopina SDS, ddH₂O) pred dodatkom raztopine APS in TEMED razplinjujemo 10 min v ultrazvočni kopeli.

- pufer za uravnovešenje trakov – osnovni:

Preglednica 4: Sestava pufra za uravnovešenje trakov z imobiliziranim pH gradientom – osnovni

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	5 mL	75 mM
urea (Sigma)	36 g	6 M
glicerol (Sigma)	30 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

- pufer za uravnovešenje I

Zatehtamo 0,2 g DTT (Sigma) v falkonko in dodamo 20 mL pufra za uravnovešenje – osnovni. Zmešamo, da se raztopi in razdelimo v 2 epruveti po 10 mL.

- pufer za uravnoteženje II

Zatehtamo 0,96 g JAA (Sigma) v falkonko in dodamo 20 mL pufra za uravnoteženje – osnovni. Zmešamo, da se raztopi in razdelimo v 2 epruveti po 10 mL.

- Raztopina proteinov znanih molekulskih mas za SDS - PAGE (10 – 220 kDa) (Invitrogen)
- agarozna raztopina:

Preglednica 5: Sestava agarozne raztopine

Sestavine	Količina
agaroza (Sigma)	0,5 g
BFM (Sigma)	1 kristalček
dodamo 1x SDS elektroforetski pufer do 100 mL	

- 5x SDS elektroforetski pufer:

Preglednica 6: Sestava 5x SDS elektroforetskega pufra

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

- 1x SDS elektroforetski pufer:

Preglednica 7: Sestava 1x SDS elektroforetskega pufra

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

Detekcija celokupnih proteinov

- fiksacijska raztopina:

Preglednica 8: Sestava fiksacijske raztopine

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
100 % (v/v) metanol (Merck)	500 mL	50 % (v/v)
100% (v/v) ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1000 mL		

- barvilo Sypro Ruby ((Invitrogen)
- raztopina za razbarvanje:

Preglednica 9: Sestava raztopine za razbarvanje

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
100 % (v/v) metanol (Merck)	100 mL	10 % (v/v)
100% (v/v) ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1000 mL		

3.2.3 Pribor in oprema

Aparature:

- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica – (Radwag)
- suhi sterilizator
- eksikator
- centrifuga (Sigma)
- cetrifuga (Eppendorf)
- vrtinčnik (IKA R Works)
- hladilnik (LTH)
- zamrzovalnik (LTH)
- magnetno mešalo (Tehnica)
- pH meter (Metler Toledo)

- mikrovalovna pečica (Candy)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan)
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- Multiphor II elektroforetska enota (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- plastična plošča z vdolbinami (GE Healthcare)
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi (anoda in katoda) (GE Healthcare)
- nosilec s plastičnimi vdolbinami za nanos vzorca (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- MultiTemp III termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- vertikalni diskontinuiran elektroforetski sistem SE 600 (Hoffer Scientific Instruments)
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama
- hladilni sistem v obliki pretočnih cevi
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- ultrazvočna kopel (Sonis Pio)
- sistem za dokumentacijo gelov GBOX_HR (Syngene)

Steklovina (različni proizvajalci):

- steklene plošče
- tehtiči
- centrifugirke, epruvete
- čaše
- merilne bučke
- lij
- merilni valji
- pipete

Plastični material:

- 13 cm IPG - trakovi (pH 3 – 10) (BioRad)

- 1 mm distančniki
- nastavki za avtomatske pipete
- falkonke
- 1,5 mL centrifugirke (Eppendorf)
- prozorna mikrotiterska plošča
- petrijeve plošče
- plastične kadičke

Programska oprema:

- računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension (Syngene)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava rastlinskega materiala

3.3.1.1 Gojenje afriške vijolice

Vse rastline smo za namene poskusa vzugajali v rastni komori na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani. Pridobljene so bile z vegetativnim razmnoževanjem in so bile torej kloni ene matične rastline. Rastline smo, skupaj z zemljo, v kateri so rasle, prenesli na tri plastične kadičke. Le-te smo obložili z več sloji papirnatih brisač ter filter papirjem, na katerem je bila plast zemlje. Na pladnju A je bilo posajenih 8 rastlin za kontrolo, na pladnju B in C pa je bilo po šest rastlin za sušni stres. Vsaka rastlina v posamezni fazì suše je predstavljala eno biološko ponovitev. Za vsako fazo suše in začetno ter končno kontrolo smo imeli po tri biološke ponovitve. Po 2 mesecih aklimatizacije, med katero smo rastline redno zalivali in pršili z vodo, smo najprej prenehali z zalivanjem pladnja C (3. in 4. faza suše) ter nato še pladnja B (1. in 2. faza suše) in s tem povzročili sušni stres pri rastlinah (Preglednica 10). Kontrolne rastline smo zalivali ves čas ter tako vzdrževali vlažno podlago. Rastline so rasle v rastni komori, kjer so bile dnevno osvetljene 16 ur z močjo $121,3 \text{ W/m}^2$, dnevna temperatura je bila $25 - 27^\circ\text{C}$, nočna temperatura $19 - 21^\circ\text{C}$, relativna vlažnost zraka pa je bila $70 - 80\%$. Ko smo uvedli sušne pogoje smo temperaturo uravnali pri $27 - 29^\circ\text{C}$, relativno vlažnost zraka v komori pa na $40 - 50\%$.

Preglednica 10: Vzorci rastlinskega materiala (afriška vijolica), ki smo ga uporabili pri analizah

Vzorec	Začetek suše	Pobiranje listov	Trajanje suše
SpK1	/	25. 8.	/
SpK2	/	10. 10.	/
SpS1	15. 8.	25. 8.	10 dni
SpS2	15. 8.	4. 9.	20 dni
SpS3	7. 8.	11. 9.	35 dni
SpS4	7. 8.	10. 10.	64 dni
SpS5	/	/	3 mesece

Kratice označujejo: SpK1 - *Saintpaulia ionantha* 1. kontrola, SpK2 - *Saintpaulia ionantha* 2. kontrola, SpS1 - *Saintpaulia ionantha* 1. faza suše, SpS2 - *Saintpaulia ionantha* 2. faza suše, SpS3 - *Saintpaulia ionantha* 3. faza suše, SpS4 - *Saintpaulia ionantha* 4. faza suše, SpS5 - *Saintpaulia ionantha* 5. faza suše

Ko smo liste rastlin v posameznih fazah suše odrezali in shranili za nadaljnje raziskave, smo vsako afriško vijolico iz kadičke presadili v lonček in jo nato redno zalivali. Tako smo lahko spremljali sposobnost rehidracije suši izpostavljenih rastlin.

3.3.1.2 Gojenje ramonde

Dve rastlini ramonde, ki smo jih dobili za raziskave, smo gojili v isti rastni komori kot afriško vijolico pod pogoji opisanimi v 3.3.1.1. Ramondi smo skupaj z zemljo, v kateri so rasle in bile prinesene v Ljubljano, postavili v plastično kadičko. Na le-to smo predhodno položili papirnato brisačo in nekaj zemlje ter vse skupaj obložili z mahom. Po sedmih dneh aklimatizacije, med katero smo rastlini redno pršili z vodo in vzdrževali vlažno podlago, smo jih ločili v dve plastični kadički. Eno ramondo smo nehalo zalivati in jo s tem izpostavili suši, drugo pa smo redno vlažili. Pred začetkom postopka suše smo s kontrolne rastline odvzeli en list, ga zamrzeli v tekočem dušiku in shranili pri -70 °C. Ramonde, izpostavljeno sušnemu stresu, nismo zalivali 19 dni.

Sposobnosti rehidracije pri ramonah nismo preverjali, saj smo obema rastlinama porezali in še za potrebe ostalih raziskav shranili vse liste.

3.3.1.3 Pobiranje in shranjevanje rastlinskega materiala

Pobiranje listov kontrolnih in suši izpostavljenih rastlin je bilo enako tako pri afriški vijolici kot pri ramondi, in sicer je vedno potekalo v dopoldanskem času. Zdrave liste za analize smo odrezali iz srednjega dela rozete. Za pripravo listnih ekstraktov afriške vijolice smo v fazah suše z vsake od treh rastlin, ki so predstavljale tri biološke ponovitve določene faze suše, že v rastni komori odrezali po dva lista, ju dali na led prekrit z alu folijo, liste prekrili, prenesli do laboratorija in ju takoj stehtali. Tako je sveža teža lista ostala konstanta oziroma se je spremajala le minimalno. Nato smo lista takoj zamrznili v tekočem dušiku ter shranili pri - 70 °C. Za določitev VV in RVV pa smo z vsake od rastlin odrezali po en list. Za pripravo listnih ekstraktov ramonde je bil postopek enak, le da smo bili omejeni pri številu rastlin in s tem pri bioloških ponovitvah.

3.3.2 Določanje vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnosti vode (RVV) v listih

3.3.2.1 Določanje VV

Vsebnost vode nam pove odstotek vode v odrezanem listu glede na celotno maso lista in jo določimo na osnovi sveže (m_1) in suhe (m_2) mase listov po sledeči enačbi:

$$VV(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \dots (1)$$

Za kontrolo in za vsako fazo suše smo od vsake od treh rastlin odrezali po en list približno enake velikosti kot so bili ostali listi za vzorčenje, ga takoj zaprli v steklen tehtič oziroma epruveto z zamaškom, ga stehtali in mu tako določili svežo maso (m_1). List smo nato na 80 °C sušili 24 ur oz. do konstantne teže, ga stehtali in mu tako določili suho maso (m_2). Na osnovi pridobljenih mas smo s pomočjo enačbe 1 izračunali VV.

Postopek za določevanje VV zemlje, v katerih so rasle rastline, je bil podoben zgoraj opisanemu, le da smo uporabili plastične epruvete z zamaški, vanje pa smo po vsakem

vzorčenju dali nekaj zemlje (m_1), jo na 80 °C sušili 24 ur oz. do konstantne teže in jo ponovno stehtali (m_2).

3.3.2.2 Določanje RVV

Relativna vsebnost vode nam pove vsebnost vode v odrezanem listu glede na maksimalno vsebnost vode, ki jo list lahko privzame. RVV določimo na osnovi sveže (m_1) in suhe (m_2) mase listov ter mase lista, ki je popolnoma nasičen z vodo (m_{nas}) po sledeči enačbi:

$$RVV(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_{nas} - m_2} \times 100 \quad \dots (2)$$

List smo odrezali, dali v tehtič, stehtali in mu s tem določili svežo maso (m_1). Nato smo list položili v petrijevko z omočenimi papirnatimi brisačami. Pecelj lista smo ovili z omočenim kosmom vate. Pokrito petrijevko smo pustili 24 ur, da je list privzel vodo. Nato smo list prenesli v tehtič, stehtali in dobili maso po saturaciji oz. maso lista, ko je popolnoma nasičen z vodo (m_{nas}). Listu smo nato še določili suho maso (m_2) s 24-urnim sušenjem pri 80 °C. Na osnovi pridobljenih mas smo s pomočjo enačbe 2 izračunali RVV.

3.3.3 Priprava celičnih ekstraktov iz listov - ekstrakcija proteinov

Pripravo ekstrakta smo začeli s homogenizacijo in drobljenjem listov v tekočem dušiku v terilnici v droben prah. Po dva v tekočem dušiku zamrznjena lista vsake biološke ponovitve, smo homogenizirali posebej. Tako zdrobljen rastlinski material smo prenesli v drugo terilnico na ledu in dodali PVP (2,5 g PVP/1 g suhe mase) ter pufer za ekstrakcijo (23 mL pufra za ekstrakcijo/1 g suhe mase) (Preglednica 1). Po ponovnem trenju smo pridobljen ekstrakt prefiltrirali skozi plenično predlogo v liju v centrifugirko na ledu, v enakih količinah razdelili v epice ter centrifugirali (13200 obratov/min, 15 min, 4 °C). Pridobljeni supernatant smo ustrezno alikvotirali, zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C.

3.3.4 Določanje koncentracije proteinov v ekstraktih

Uporabili smo metodo po Bradfordu (Bradford, 1976), ki temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 na stranske skupine arginina in lizina na proteinu. V kislem mediju se na protein veže anionska modra oblika barvila. Koncentracijo proteinov določimo z merjenjem absorbance modrega barvnega proteinskega kompleksa pri 595 nm. Absorbanco kompleksa lahko merimo po 5 minutah, stabilen pa ostane največ do eno uro.

Za merjenje koncentracije proteinov v ekstraktih smo v jamico mikrotiterske plošče z ravnim dnom odpipetirali 4 µL ekstrakta, dodali 196 µL 5-krat redčenega Bradfordovega reagenta, premešali, ter po 5 minutah izmerili absorbanco na čitalcu mikrotiterskih plošč.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z BSA. Naredili smo redčitve BSA v 0,15 M NaCl z naslednjimi koncentracijami BSA: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 in 1mg/mL. 4 µL posamezne redčitve smo odpipetirali v vdolbinico mikrotiterske ploščice ter k vsaki redčitvi dodali po 196 µL Bradfordovega reagenta. Absorbanco smo izmerili na čitalcu mikrotiterskih plošč pri valovni dolžini 595 nm. Na podlagi rezultatov smo naredili umeritveno krivuljo (Priloga A) ter po njej izračunali koncentracijo proteinov v ekstraktih.

3.3.5 Čiščenje proteinskih ekstraktov

Prvi del čiščenja smo izvedli že med samo ekstrakcijo z dodatkom PVP, s katerim smo odstranili neželene fenolne snovi. Nadaljnji postopek čiščenja proteinskih ekstraktov smo izvedli z uporabo kompleta za čiščenje proteinskih ekstraktov (2-D Clean Up kit), ki temelji naobarjanju proteinov in odstranjevanju motečih snovi, kot so detergenti, soli, lipidi, fenoli in nukleinske kisline (Stasyk in sod., 2001).

Čiščenje proteinov v ekstraktih smo izvedli po navodilih proizvajalca.

150 µL vzorca ekstrakta smo prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 3-kratni volumen precipitanta, premešali na vrtinčniku in inkubirali na ledu 15 minut. Nato smo mešanici

vzorca in precipitanta dodali 3-kratni volumen koprecipitanta ($500 \mu\text{L}$), premešali na vrtinčniku in centrifugirali 10 minut pri 8000 g in 4°C . S previdnim pipetiranjem smo odstranili supernatant in pazili, da se sediment ni resuspendiral. Dodali smo koprecipitant ($80 \mu\text{L}$), 5 minut inkubirali na ledu, centrifugirali 5 minut pri 8000 g in 4°C . Odstranili smo supernatant, dodali bidestilirano vodo ($50 \mu\text{L}$), mešali na vrtinčniku, da se je sediment resuspendiral. Dodali smo pufer za izpiranje (1 mL), ki je bil predhodno ohlajen na -20°C , in aditiv ($5 \mu\text{L}$) ter zopet mešali na vrtinčniku. Sledila je 30 minutna inkubacija vzorca pri -20°C ter mešanje na vrtinčniku vsakih 10 minut. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 8000 g in 4°C , odstranili supernatant, sediment največ 5 minut sušili na zraku, do nanosa na gel pa smo pelet v epicah shranili pri -20°C .

3.3.6 Dvodimenzionalna elektroforeza

Dvodimenzionalna (2-D) elektroforeza zajema, kot nam že ime pove, ločevanje proteinov v dveh dimenzijah. Vsi proteini imajo naboj, ki je odvisen od števila kislih in bazičnih preostankov v proteinu. V prvi dimenziji potujejo v gelu z imobiliziranim pH gradientom do točke, kjer je njihov neto naboj enak nič. To točko oz. pH, kjer se protein ustavi, imenujemo izoelektrična točka (pI), to tehniko pa izoelektrično fokusiranje. Sledi druga dimenzija, kjer pa se proteini ločijo glede na molekulsko maso (SDS-PAGE) (Nelson in Cox, 2000).

2-D elektroforezo smo izvedli po metodi z modifikacijo 1. dimenzije (O'Farrell, 1975). Ta vključuje uporabo komercialnih trakov z imobiliziranim pH gradientom (Görg, 1991).

3.3.6.1 Prva dimenzija

Rehidracija trakov z imobiliziranim pH gradientom

Očiščen proteinski pelet smo raztopili v ustreznom volumnu raztopine za rehidracijo trakov (Preglednica 2) s predhodno dodanim DTT, mešali na vrtinčniku, da se je pelet popolnoma raztopil, ponovno centrifugirali (8000 g , 20°C), da smo odstranili morebitne netopne snovi.

Sledil je nanos vzorca na trakove z imobiliziranim pH gradientom (v nadaljevanju IPG trakove). Masa proteinov na gel je bila 150 µg. Uporabili smo IPG trakove s pH gradientom 3 - 10, dolžine 13 cm, ki smo jih hranili na -20 °C. Za rehidracijo IPG trakov smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo postavili v ravnotežno pozicijo in na sredino reže odpipetirali 250 µL raztopine za rehidracijo trakov z vključenim očiščenim proteinskim peletom. Z IPG traku smo odstranili plastično folijo, ki je prekrivala gel, in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov položili v režo z gelom obrnjenim navzdol. Rehidracijski pufer s proteini se je tako enakomerno porazdelil po celotni dolžini traku. IPG trak smo prekrili s 3 mL mineralnega olja, da smo preprečili izhlapevanje in nastajanje kristalov uree. Podstavek z IPG trakovi v režah smo pokrili s pokrovom in pustili, da je rehidracija trakov potekala čez noč.

Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Na ploščo, ki med potekom izoelektričnega fokusiranja zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C, saj je povezana z vodno kopeljo, smo v štirih vertikalnih črtah nanesli 4 mL mineralnega olja. Na to smo položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki (anodni priključek na zgornjem koncu), vanj na sredino vlili 10 mL mineralnega olja ter na to položili ploščo z vdolbinami za trakove. Rehidriran IPG trak smo vzeli s podstavka z režami za rehidracijo trakov, ga potopili v merilni valj napolnjen z bidestilirano vodo ter ga nato sprali še s curkom bidestilirane vode. S tem smo odstranili proteine, ki niso vstopili v gel, in morebitne kristale uree. Trak z gelom obrnjenim navzgor smo osušili na papirnatem robčku. Tako pripravljene IPG trakove smo enega za drugim polagali na ploščo z vdolbinami za trakove in pazili, da so bili plus konci trakov na zgornji, anodni strani ter da so bili trakovi poravnani. Nato smo ustrezno dolga, v bidestilirani vodi omočena in popivnana elektrodna trakova položili pravokotno preko trakov na plus in minus koncu. Čez njiju smo previdno namestili elektrodi (plus konec – anoda, minus konec – katoda). IPG trakove smo prelili s 150 mL mineralnega olja in pokrili s pokrovom.

Elektroforetsko enoto smo povezali z usmernikom ter nastavili naslednje štiri faze izoelektričnega fokusiranja:

1. faza: doseganje 300 V, 1 min
2. faza: 300 V, 1 h
3. faza: doseganje 3500 V, 1 h 30 min
4. faza: 3500 V, 5 h

Kmalu po začetku IEF smo lahko videli potovanje modrega barvila v IPG trakovih proti plus koncu, ki se je na koncu zbral v elektrodnem traku in je bil rumene barve zaradi bazičnega pH. Po končani IEF smo previdno odstranili elektrodi in elektrodnatakova, IPG trakova skupaj zavarili v plastične mape ter jih do izvedbe druge dimenzije shranili na -80 °C.

3.3.6.2 Druga dimenzija

V drugi dimenziji smo proteine ekstraktov ločevali v poliakrilamidnem ločilnem gelu glede na molekulsko maso proteinov.

Vlivanje gelov za SDS-PAGE

Med dve stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi deli tvorita kalup, smo vlili 19 mL ločilnega gela (Preglednica 3), nato smo previdno dolili še bidestilirano vodo do cca. 1 cm pod zgornjim robom stekla. S tem smo preprečili dostop kisika do gela, ki bi motil polimerizacijo, in zagotovili ravno površino gela. Gele smo pustili polimerizirati čez noč, pred nadaljnjo uporabo smo vodo odlili in gele dobro osušili.

Uravnoteženje IPG trakov

Trakove smo vzeli iz zamrzovalnika, jih prenesli v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje I in stresali 15 minut na stresalniku. Nato smo prenesli trakove v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje II ter ponovno pustili na stresalniku 15 minut. Pred prenosom trakov na gel smo jih popivnali na filter papirju ter po potrebi odrezali konce trakov.

Nanos markerja

Na majhen košček filter papirja smo nanesli raztopino proteinov znanih molekulskeih mas za SDS-PAGE (10–220 kDa). Ko smo prenašali trakove na gel, smo filter papir z markerjem vstavili med stekleni plošči na levo stran gela.

Prenos traku na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo do vrha steklenih plošč nalili agarozno raztopino (Preglednica 5), ki smo jo prej segreli na 100 °C. Nato smo trak spustili v režo med stekli in ga s pomočjo igle potisnili do ločilnega gela. Strjena agaroza je tako fiksirala gel.

SDS - PAGE elektroforeza

Ko se je agaroza strdila, smo kalup namestili v posodi, kjer se nahajata elektrodi. Obe posodi smo napolnili z 1x SDS elektroforetskim pufrom (Preglednica 7). Tako pripravljen elektroforetski sistem smo povezali z usmernikom ter s povezavo na hladilni sistem zagotovili konstantno temperaturo 20 °C. Potovanje proteinov v smeri anode je najprej potekalo 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel, nato pa pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba gela. Nato smo elektroforezo ustavili, previdno odstranili vse dele in gele ustrezno označili.

3.3.7 Detekcija proteinov na gelu

Fiksacija

V kadički na stresalniku smo 2-krat po 30 minut fiksirali po dva gela skupaj v 300 mL fiksacijske raztopine (Preglednica 8). Po vsaki fiksaciji smo raztopino odlili. S fiksacijo smo preprečili difuzijo proteinov in sprali SDS.

Barvanje

Geloma v kadički smo prilili 300 mL barvila Sypro Ruby in čez noč pustili na stresalniku. Delali smo v temi, kadičke smo pred svetlobo dodatno zaščitili z aluminjasto folijo.

Razbarvanje

Gela smo previdno prenesli v novo kadičko in dodali 300 mL raztopine za razbarvanje (Preglednica 9). Razbarvali smo dvakrat po 30 minut na stresalniku v temi.

Izpiranje

Po dva gela skupaj smo izpirali trikrat po 5 minut v bdestilirani vodi na stresalniku.

3.3.8 Slikanje gelov in računalniška obdelava slik

2-D gele smo slikali z uporabo dokumentacijskega sistema GBOX_HR (Syngene). Slike gelov smo nato obdelali z računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). Med sabo smo lahko primerjali več slik gelov. Kontrolni gel (vzorec, ki smo ga pripravili iz listov zalivane rastline) smo postavili kot referenčnega, s katerim smo primerjali ostale gele (vse faze suše). Za vsak vzorec sta bila v analizo vzeta 2 gela. S programom smo določili točno lego 2-D elektroforetskih lis (jih obkrožil) in kvantitativno ovrednotil vsako liso na podlagi normaliziranega volumna. Le-ta pomeni razmerje med volumnom ene lise glede na celokupen volumen vseh lis na gelu. Sledilo je ujemanje in primerjava lis med geli. Vsa ujemanja, poravnave lis na gelih smo preverili še z ročnim pregledovanjem slik. V programu se izriše preglednica s številkami lis, ki predstavljajo isto liso na vseh gelih in njihovo razmerje normaliziranih volumnov glede na kontrolni gel (relativne vrednosti, R). Kot diferencialno izražene proteine smo upoštevali le tiste, kjer je bilo razmerje $R > 2$ in statistično značilno ($p < 0,05$). Statistična značilnost diferencialnega izražanja je bila preverjena s t-testom, saj smo v računalniško obdelavo vključili po 2 gela vsake biološke ponovitve.

3.3.9 Identifikacija proteinov

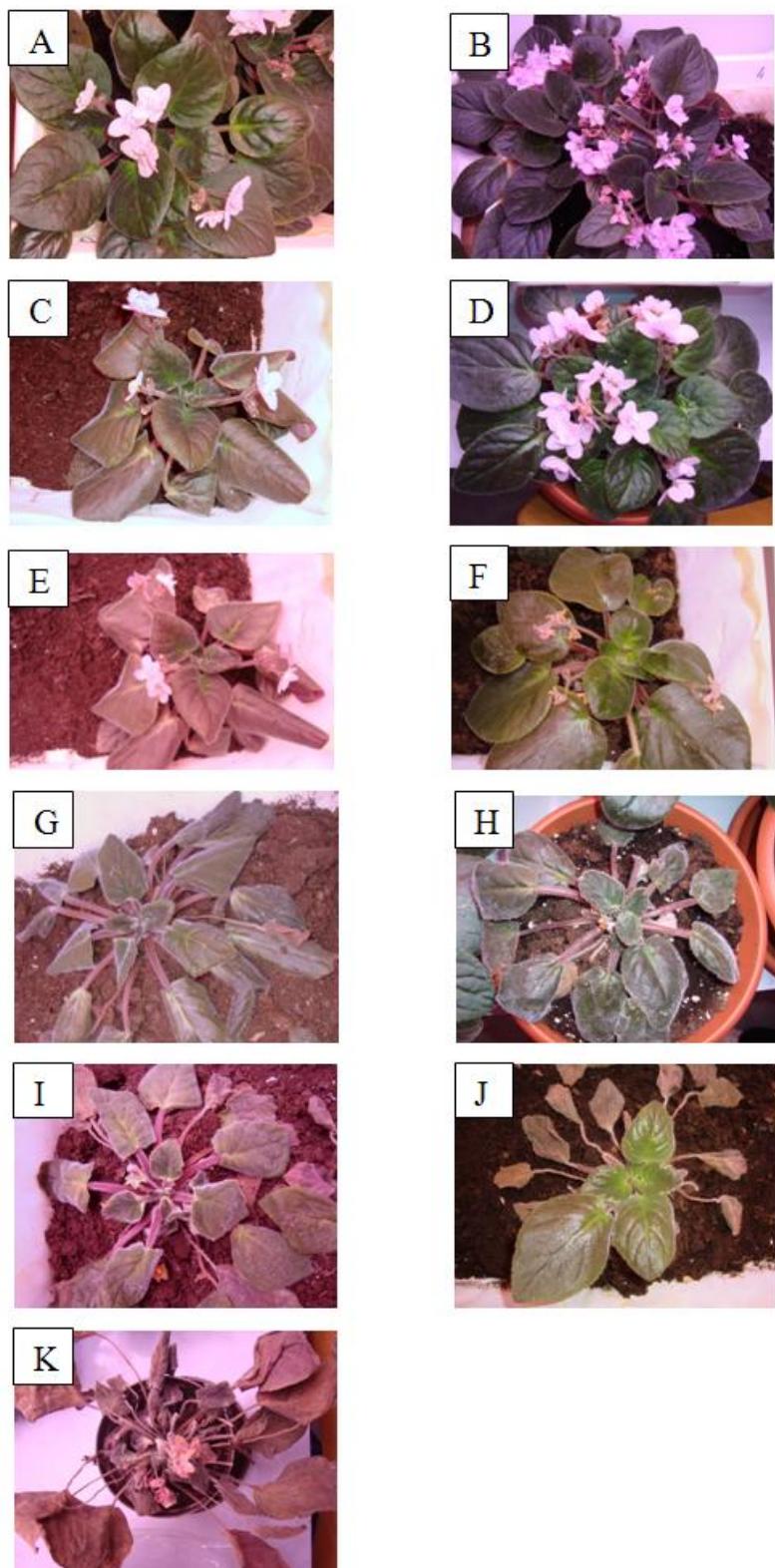
Izbrane proteine smo izrezali iz gelov in jih poslali na analizo z masno spektrometrijo (LC-MS/MS) z uporabo inšumenta ESI-TRAP (Institute of Medical Sciences, Aberdeen). Analiza MS spektrov je bila obdelana s programom Mascot. Uporabljena je bila

podatkovna zbirka NCBInr (NCBInr 20091128). Parametri iskanja so bili sledeči: masna toleranca peptidov $\pm 1,5$ Da, masna toleranca fragmentov $\pm 0,5$ Da. Oksidacija metionina in karbamidometilacija sta bili upoštevani kot možni modifikaciji proteinov.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE (VV) IN RELATIVNE VSEBNOSTI VODE (RVV) TER SPOSOBNOSTI REHIDRACIJE

Ustrezna priprava bioloških vzorcev, v našem primeru rastlinskega materiala, je bila eden ključnih korakov h končnim rezultatom proteomskeih analiz. Ob pobiranju in shranjevanju listov smo določili VV in RVV, kar je dopolnilo naš vizualni opis stanja rastlin. Določili smo tudi VV zemlje, ki je kazal na dostopnost vode v zemlji. Pozorno smo spremljali morfološke lastnosti kontrolnih rastlin ter rastlin, ki so bile pod sušnim stresom (Preglednica 11). Opazili smo veliko razliko med afriško vijolico in ramondo v njunem odzivu na pomanjkanje vode. Pri afriški vijolici so listi pri postopno daljšem obdobju brez vode postajali vedno bolj ohlapni in tanjši. Ta proces se je začel šele okoli dva tedna po prenehanju zalivanja, na začetku samo pri najstarejših listih na robu rozete. Sčasoma so začeli veneti tudi sredinski in najmanjši listi. Po več kot mesecu dni, ko so rastline počrpale že skoraj vso razpoložljivo vodo iz zemlje, so imele rastline še vedno nekaj mladih, neovenelih, zelenih listkov. Po 64-ih dnevih suše so se začeli sušiti od roba rozete proti sredini, dokler se niso popolnoma posušili in otrdeli. Različno dolgo pomanjkanje vode je vplivalo na sposobnost rehidracije rastlin afriške vijolice. Rehidrirali so se le listi, ki niso bili posušeni.

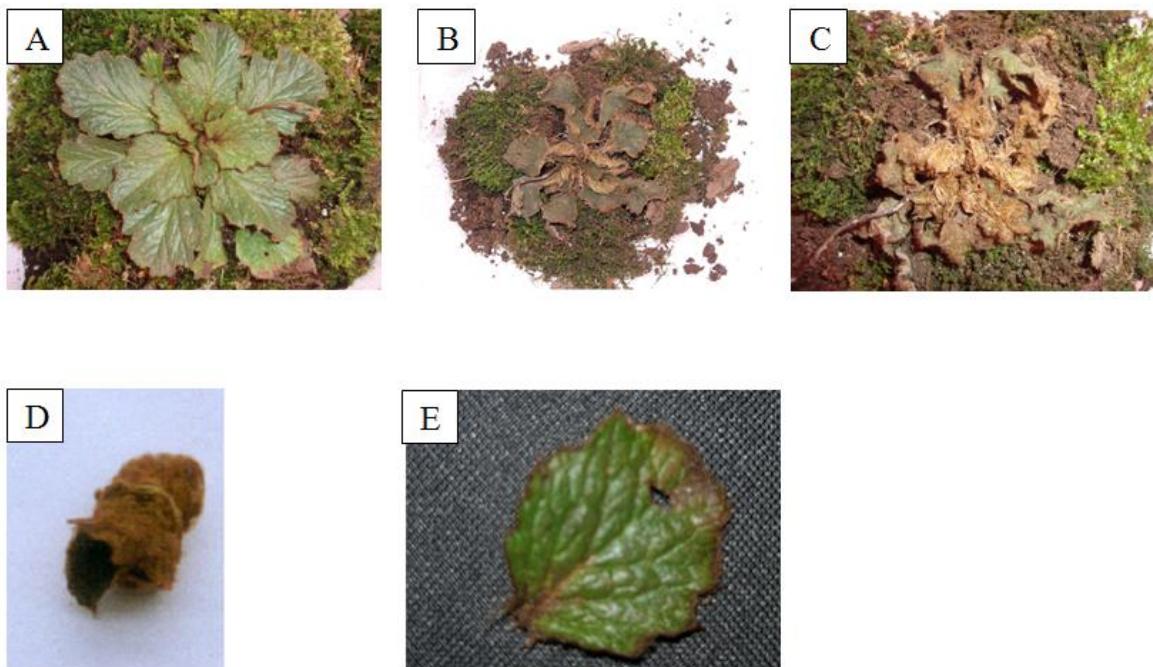


Slika 2: Vpliv trajanja izpostavljenosti pomanjkanju vode na afriško vijolico. **A** in **B**: Kontrolni rastlini na začetku in koncu poskusa, ki sta bili redno zalivani; **C** in **D**: 1. faza suše (10 dni) in po rehidraciji; **E** in **F**: 2. faza suše (20 dni) in po rehidraciji; **G** in **H**: 3. faza suše (35 dni) in po rehidraciji; **I** in **J**: 4. faza suše (64 dni) in po rehidraciji; **K**: 5. faza suše (3 meseci)

Preglednica 11: Vrednosti vode v listih (VV), relativne vseb. vode v listih (RVV) in vsebnosti vode v zemlji (VVz), morfološke lastnosti rastlin in njihova sposobnost rehidracije v povezavi z različno dolgimi fazami suše pri afriški vijolici

	Vzorec	Trajanje suše	VV (%)	RVV (%)	VVz (%)	Morfološke lastnosti/stanje rastlin	Rehidracija rastlin
KONTROLA	SpK1	/	95,8	98,9	76,0	Bujna rast, listi niso uveli ali rjavci, rastline cvetijo.	/
	SpK2	/	94,9	92,3	66,0	Bujna rast, listi niso uveli ali rjavci, rastline cvetijo.	/
SUŠA	SpS1	10 dni	94,3	86,3	17,1	Rast ni upočasnjena, zunanji listi rahlo venijo, cvetijo in imajo popke, vendar manj kot kontrola.	Rehidrirali so se vsi listi. V nekaj dneh rastline v rasti in cvetenju dosegle kontrolo in ni vidne razlike med njimi.
	SpS2	20 dni	92,8	80,3	10,6	Rast rahlo upočasnjena, listi precej uveli, pecelj še vedno trd, cvetijo in tudi še imajo popke, vendar manj kot kontrola.	Rehidrirali so se tudi najbolj uveli zunanji listi rozete, posušil se je le eden. Po 14 dneh v rasti (premeru listov) še ni enaka kontroli, ne cveti, ima pa popke.
	SpS3	35 dni	89,8	80,8	9,0	Rast je zelo upočasnjena, zunanji listi in peclji so zelo uveli, ob robovih uvihajo navzdol, prisotni le 2 - 3 manjši notranji listki rozete, cvetov in popkov ni.	Listi so se skoraj popolnoma rehidrirali, peclji so trdi. 2-3 listi na rastlino ne kažejo znakov rehidracije in se sušijo, 2-3 listi pa kažejo znake delne rehidracije (konica lista suha). Po enem tednu nastaja veliko mladih listkov. Tudi po mesecu dni opazna intenzivna rast, velikost listov še vedno zaostaja za kontrolo. Ne cvetijo, poganjajo prvi popki.
	SpS4	64 dni	86,0	70,1	10,2	Rast je močno upočasnjena, prisotni le 2-3 manjši notranji listki rozete, cca. 10 zunanjih listov se je že posušilo, srednji listi so se začeli zelo tanjšati, slabijo od kanice lista proti peclju, listi se uvihajo navzdol in so zbledeli, cvetov in popkov ni.	Četri dan rehidracije so rehidrirani vsi listi razen že prej suhih. Dodatno se je posušil le cca. 1zunanji list na rastlino.
	SpS5	3 meseci	40,0	/	/	Vsi listi suhi in rjavci.	Rastlina se ni rehidrirala.

Pri ramondi so se listi začeli sušiti opazno hitreje. Že po dveh dneh brez zalivanja so vsi listi postali mehkejši, potem pa so se, razen najstarejših na robu rozete, začeli zvijati navznoter in oblikovati trd tulec. V primerjavi z afriško vijolico se je torej ramonda začela sušiti mnogo hitreje, že samo po petih dneh nezalivanja je izgledala kot popolnoma suha, mrtva rastlina. Izjemna lastnost ramond pa je, da obdržijo sposobnost rehidracije tudi po dolgotrajni izsušitvi (Dražić in sod., 1999). Ker smo lahko suši izpostavili le eno rastlino ramonde in smo ekstrakte njenih listov porabili še za druge analize, nismo imeli možnosti poskusiti rehidrirati cele rastline. En popolnoma suh list ramonde smo za 24 ur položili v petrijevko obloženo z ovlaženo papirnato brisačo. List se je razvil in bil popolnoma podoben listom rastline, ki je bila redno zalivana.



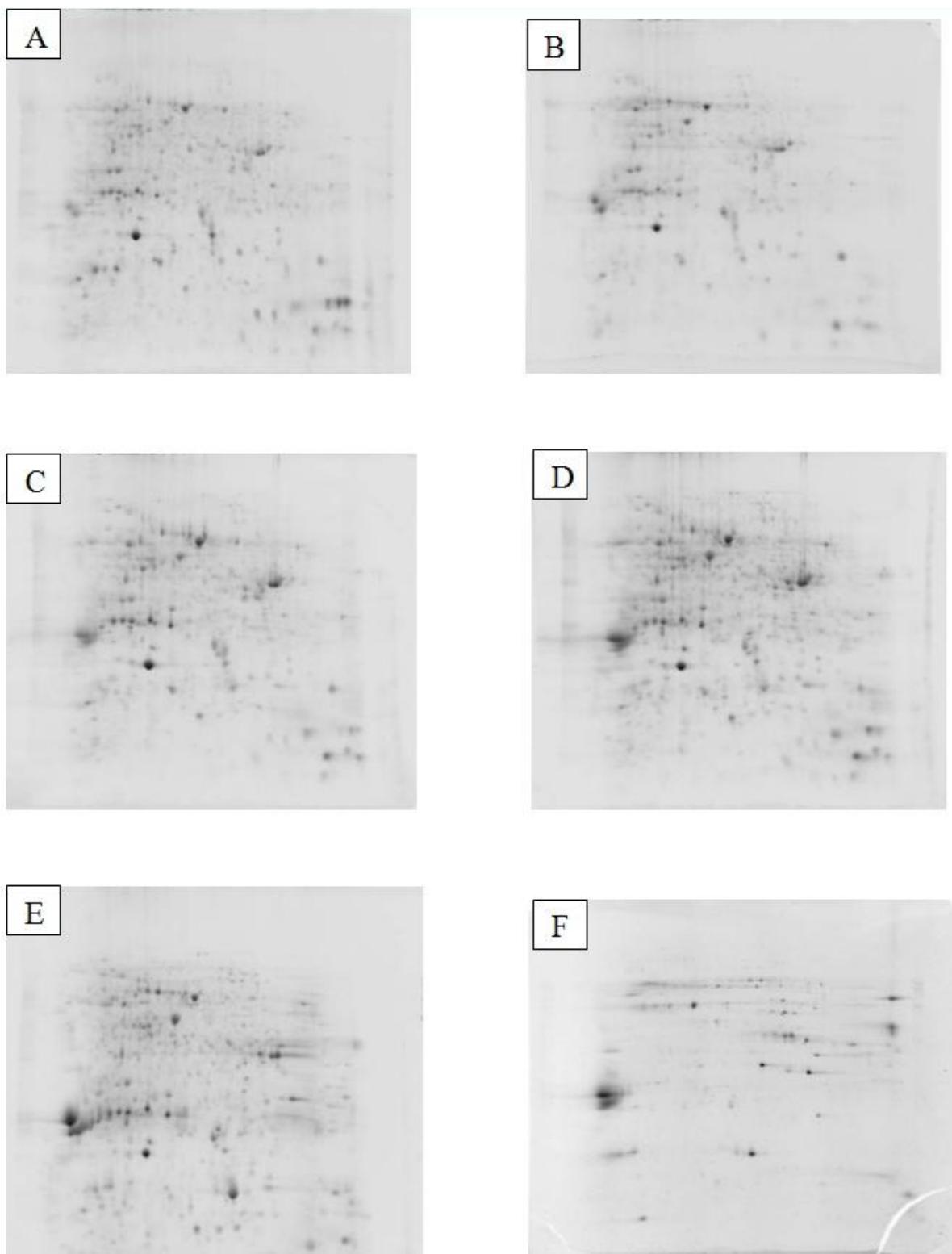
Slika 3: Vpliv trajanja izpostavljenosti pomanjkanju vode na ramondo. **A:** kontrolna, redno zalivana rastlina; **B:** 3 dni po prenehanju zalivanja; **C:** 19 dni po prenehanju zalivanja; **D:** suh list z rastline, prikazane v C; **E:** list prikazan pod D po rehidraciji.

Preglednica 12: Vrednosti vode v listih (VV) ter morfološke lastnosti rastlin pri ramondi

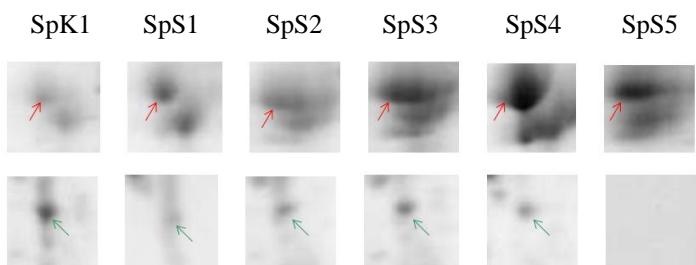
Vzorec	Trajanje suše	VV (%)	Morfološke lastnosti/stanje rastlin
RsK (kontrola)	/	75,9	Listi niso uveli, zviti ali rjavi, rastline ne cvetijo.
RsS (suša)	19 dni	7,2	Listi popolnoma suhi, trdi na otip, zviti v tulec s spodnjo, dlakavo stranjo navzven, zgornja stran lista še vedno zelena.

4.2 VPLIV SUŠE NA IZRAŽANJE PROTEINOV IN PRIMERJAVA SPREMemb PROTEINSKIH PROFILOV

Vzorce afriške vijolice smo analizirali z 2-D elektroforezo. Proteinske profile vzorcev rastlin, ki so bile izpostavljene suši, smo primerjali s kontrolnim vzorcem s pomočjo uporabe računalniškega programa 2-D Dymension.

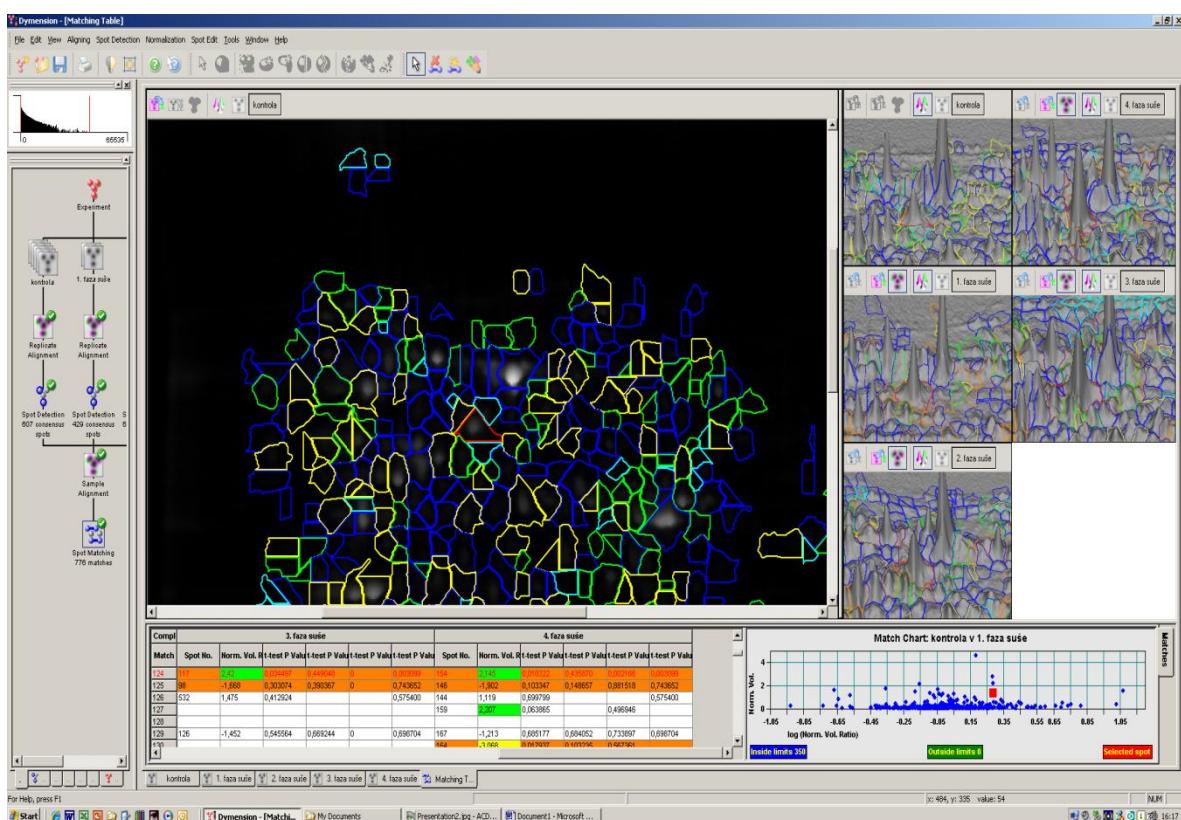


Slika 4: Prikaza reprezentativnih 2-DE gelov kontrole in posameznih faz suše pri afriški vijolici. **A:** primer 2-DE gela - kontrolna rastlina; **B:** Primer 2-DE gela – 1. faza suše (10 dni); **C:** Primer 2-DE gela – 2. faza suše (20 dni); **D:** Primer 2-DE gela – 3. faza suše (35 dni); **E:** Primer 2-DE gela – 4. faza suše (64 dni); **F:** Primer 2-DE gela – 5. faza suše (3 meseci)



Slika 5: Vpliv trajanja suše na izražanje proteinov v afriški vijolici – primer 2-D elektroforetskih lis. **RDEČE** puščice - primer induciranega gena (št. 2-DE lise: 1). **ZELENE** puščice – primer represiranega gena (št. 2-DE lise: 12).

Pri afriški vijolici smo s kontrolnim vzorcem primerjali štiri faze suše, peto fazo pa smo pregledali le ročno, saj zaradi velikih razlik v proteinskem profilu računalniška primerjava ni bila mogoča. V primerjavi s kontrolo smo že v prvi fazi suše opazili odziv afriške vijolice na pomanjkanje vode, saj se vidijo določene razlike v proteinskih profilih (Slika 4, A in B). Ta razlika v začetnih fazah suše ni tako velika, kljub temu pa smo opazili, da se izražanje nekaterih proteinov zvišuje s stopnjevanjem suše ter v zadnji, peti fazi izginejo, nekateri pa tudi še ostanejo (Slika 4, F). Nekaj proteinov se močno inducirajo šele v zadnjih fazah suše. Med z 2-D elektroforezo na gelu ločenimi proteini opazimo tudi takšne, pri katerih pride do njihove povišane sinteze le v prvi fazi suše, kasneje pa pride do represije. Vendarle pa smo pri afriški vijolici skozi stopnjujoče faze suše opazili trend splošne represije izražanja proteinov v primerjavi s kontrolo (Slika 5). Slednja je najbolj vidna v peti fazi suše. Znižano izražanje skozi faze suše na slikah ni zelo izrazito, saj se afriška vijolica bori proti suši vse do pete faze suše, ko pride do popolnega kolapsa in rastline propade. Na gelih z nanesenimi proteini iz ekstraktov listov rastlin v peti fazi suše je opaznih le majhno število 2-D elektroforetskih lis, ki predstavljajo tiste proteine, ki nerazgrajeni ostanejo tudi v peti fazi suše, v popolnoma suhih listih. Med vsemi omenjenimi proteini pa so seveda tudi takšni, pri katerih nismo opazili diferencialnega izražanja zaradi sušnega stresa. Razlike v izražanju skozi faze suše smo potrdili s kvantitativnim ovrednotenjem lis na gelu s programom 2-D Dymension.



Slika 6: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) v programu 2-D Dymension. 3D vrhovi prikazujejo indukcijo sinteze proteina od kontrolne preko štirih faz suše.

Na podlagi podatkov, pridobljenih z uporabo omenjenega programa, in še z naknadnim ročnim pregledovanjem smo dobili seznam diferencialno izraženih proteinov skozi stopnjujoče faze suše (Preglednica 13). Poseben poudarek smo dali na proteine z izrazito indukcijo oz. represijo v četrti fazi suše, za katere smo predvidevali, da bi lahko pripomogli k tako dolgemu vztrajanju afriške vijolice v pomanjkanju vode. Proteini, za katere bi sicer po vizualnem pregledu gelov lahko tudi rekli, da izstopajo oz. je pri njih opazna spremembra v velikosti lis na gelu, pa jih na omenjen seznam nismo uvrstili, niso zadostili zahtevam statistike oz. niso bili statistično značilni. V peti fazi suše smo pri ročnem pregledu opazili protein (Slika 9, št. lise 16), ki ga glede na položaj lise ni na gelih vzorcev ostalih faz suše.

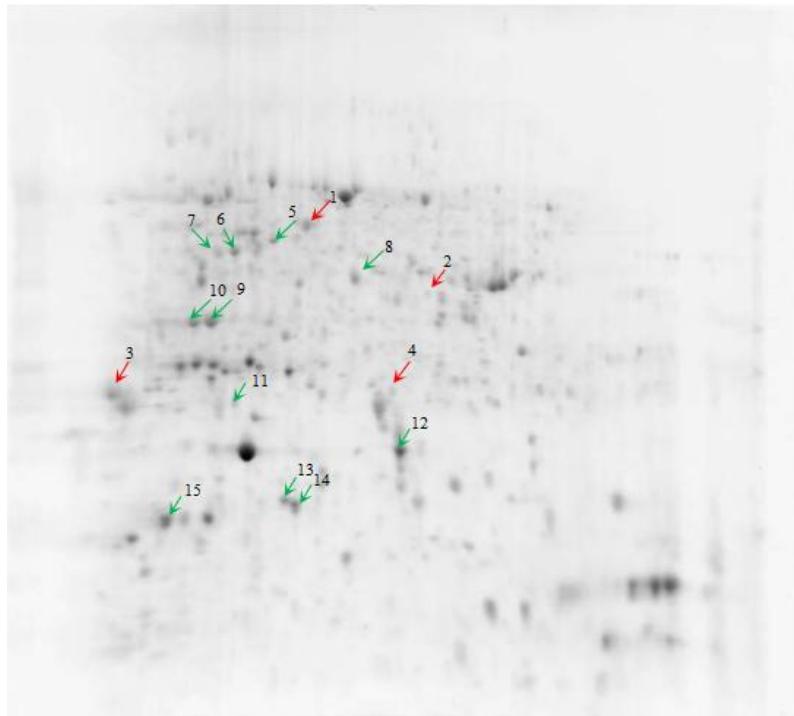
Preglednica 13: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih afriške vijolice v 4. fazi suše (64 dni)

Št. 2-D lise	Indukcija sinteze		Represija sinteze	
	R ^a	p ^b	R ^a	p ^b
1	2,145	0,01	/	/
2	2,096	0,025	/	/
3	5,471	0,01	/	/
4	2,763	0,007	/	/
5	/	/	-2,229	0,018
6	/	/	-2,327	0,001
7	/	/	-4,186	0,004
8	/	/	-2,901	0,001
9	/	/	-2,231	0,005
10	/	/	-3,495	0,001
11	/	/	-6,381	0,020
12	/	/	-3,627	0,001
13	/	/	-3,486	0,002
14	/	/	-3,844	0,004
15	/	/	-6,979	0,010

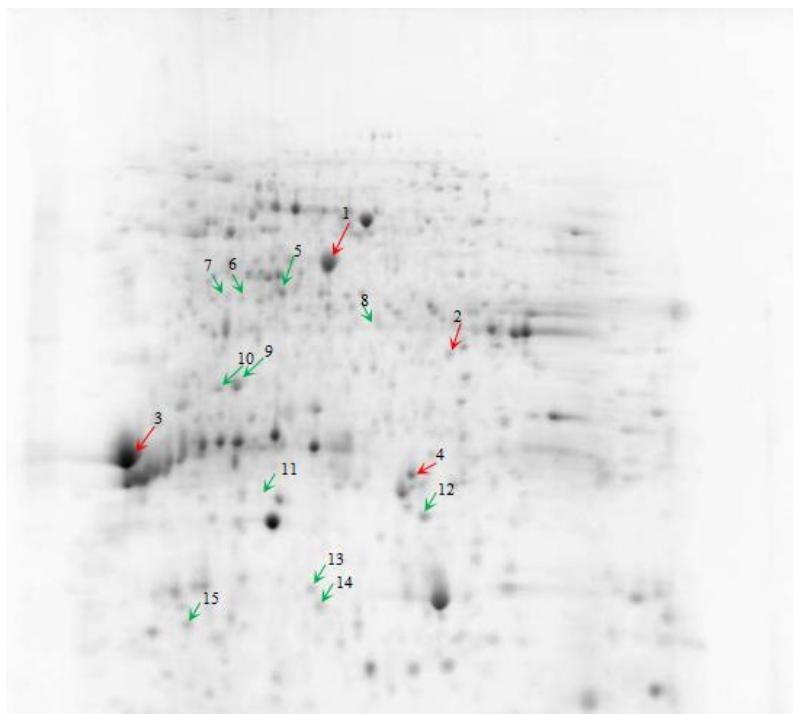
^a R – razmerje vrednosti normaliziranih columnov, izračunano s programom 2-D Dymension.

^b t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialnega izražanja.

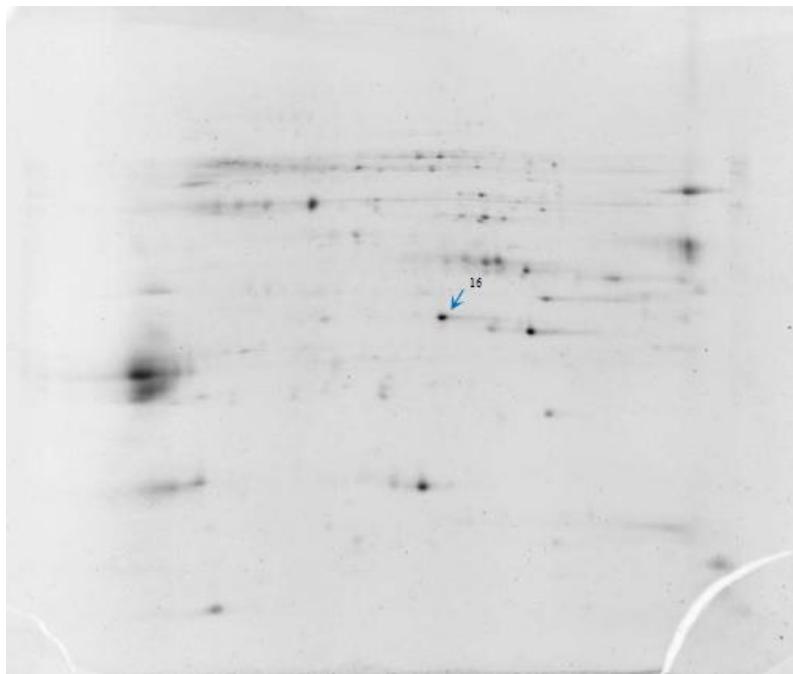
Slike 7, 8 in 9 prikazujejo reprezentativne gele kontrole, 4. in 5. faze suše pri afriški vijolici.



Slika 7: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnem vzorcu afriške vijolice (inducirani proteini so označeni z rdečimi puščicami, represirani proteini pa z zelenimi puščicami).



Slika 8: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu 4. faze suše (64 dni) afriške vijolice (inducirani proteini so označeni z rdečimi puščicami, represirani proteini pa z zelenimi puščicami).

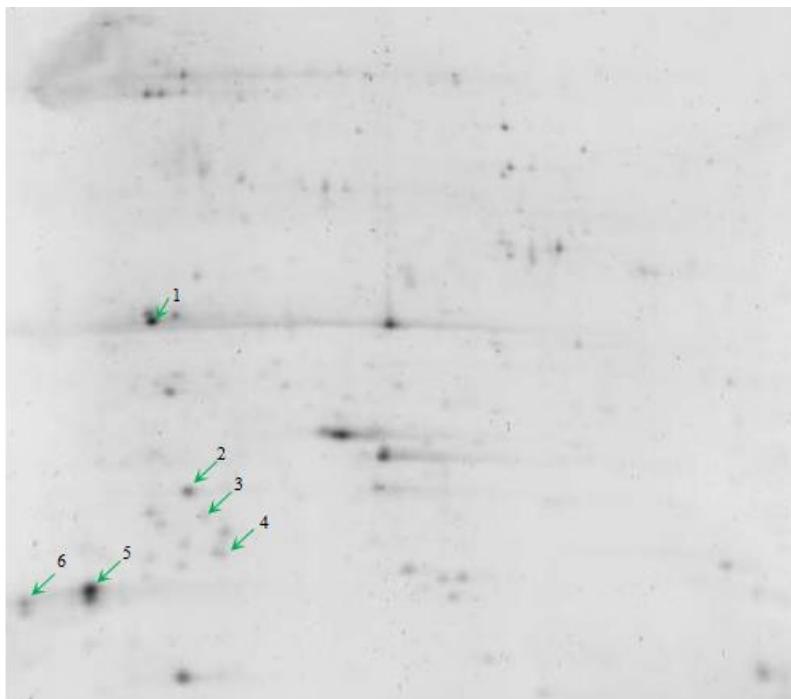


Slika 9: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu 5. faze suše (3 meseci) afriške vijolice.

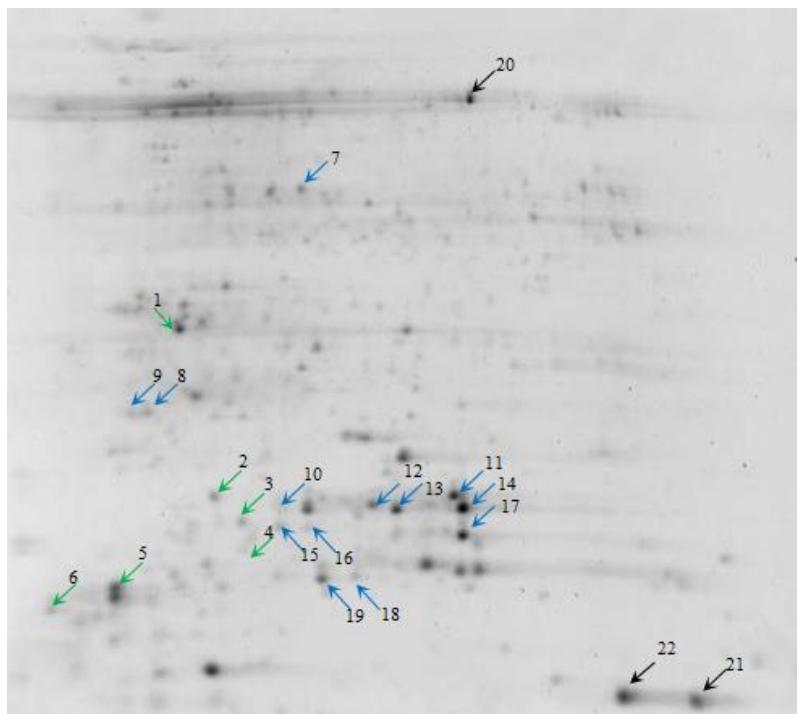
Pri ramondi smo s kontrolnim vzorcem primerjali le eno fazo suše. Po morfologiji bi se le-ta lahko primerjala s 5. fazo suše pri afriški vijolici, le da slednja za razliko od ramonde

ni sposobna rehidracije. Opazili smo visoko stopnjo *de novo* sinteze proteinov (št. lis 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 in 22) ter represijo sinteze proteinov (št. lis 1, 2, 3, 4, 5 in 6). Zanimali so nas predvsem v suši na novo sintetizirani proteini, ki bi lahko bili ključnega pomena za sposobnost rehidracije ramond tudi po daljšem sušnem obdobju. Proteine, ki so na gelu označeni pod št. lis 20, 21 in 22, smo dodali med novo sintetizirane proteine v suši po ročnem pregledu slik gelov. Zaradi omejitev računalniškega programa smo namreč robni del slik gelov izločili iz obdelave in so bili posledično ti proteini izvzeti iz računalniške analize.

Slike 10 in 11 prikazujeta reprezentativna gela kontrole in suše pri ramondi.



Slika 10: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnih vzorcih ramonde (represirani proteini so označeni z **zelenimi** puščicami).



Slika 11: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih ramonde v suši (represirani proteini so označeni z **zelenimi** puščicami; na novo sintetizirani proteini z **modrimi**; potencialno zanimivi proteini, ki pa niso bili vključeni v računalniško obdelavo, so označeni s **črnimi** puščicami)

Preglednica 14: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih ramonde v suši (19 dni)

Št. 2-D lise	Represija sinteze	
	R ^a	p ^b
1	-3,483	0,024
2	-4,082	0,036
3	-2,859	0,004
4	-3,972	0,014
5	-3,215	0,029
6	-3,178	0,001

^a R – razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension.

^b t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialnega izražanja.

Zaradi prevelike različnosti proteinskih profilov afriške vijolice in ramonde med seboj nismo primerjali.

4.3 IDENTIFIKACIJA IZBRANIH PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Na identifikacijo masno spektrometrijo smo poslali deset (afriška vijolica – št. lis 1, 4, 3, 16; ramonda – št. lis 13, 14, 17, 19, 20, 21) 2-D lis. Za identifikacijo proteinov v omenjenih lisah smo se odločili na podlagi predvidevanja, da imajo vlogo v fiziološkem odzivu na sušo. Pri afriški vijolici so nas zanimali proteini, ki so skozi štiri faze suše inducirali in verjetno pripomogli, k vztrajanju rastlin v suši, v peti fazi, pa jih na gelih nismo več opazili. Zanimali so nas tudi proteini, ki so se močneje inducirali šele v zadnjih fazah suše in ostali vidni tudi v peti fazi suše. Pri ramondi smo se omejili predvsem na identifikacijo nekaterih *de novo* sintetiziranih proteinov. Zanje smo namreč predvidevali, da bi lahko imeli pomembno vlogo pri oživitvi ramond iz na videz mrtvega stanja, ko bi bile v okolju zopet ugodne življenske razmere. Ker genom afriške vijolice in ramonde ni poznan, posledično tudi ni poznana proteinska mapa. Iz tega razloga je bilo potrebno v postopku identifikacije iskati homologijo z že znanimi proteini rastlin, ki že imajo narejeno proteinsko mapo, posledično so bili rezultati identifikacije omejeni. Od desetih proteinov, ki smo jih poslali v analizo, smo uspešno identificirali 3 proteine (Preglednica 15).

Preglednica 15: Seznam identificiranih proteinov v listih afriške vijolice in ramonde

Številka 2-D lise	R ^a	p ^b	Ime proteina	Pristopna številka ^c	SC (%) ^d	Seštevek ^e
AFRIŠKA VIJOLICA						
1	2,145	0,01	Pektin metilesteraza	gi 1321997	14	287
4	2,763	0,007	Beta podenota proteasoma	gi 14594933	5	57
RAMONDA						
20	/	/	Rubisco, velika odenota	gi 2597910	29	700

^a R – razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension.

^b t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialnega izražanja.

^c Pristopna številka v NCBI podatkovni bazi.

^d Odstotek v pokritosti aminokislinske sekvence ujemanih peptidov v identificiranem proteinu.

^e MASCOT “score” za najvišji, najbolj značilen zadetek.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5. 1 RAZPRAVA

V naravi skorajda ni rastlinske vrste, ki ne bi bila tekom življenskega cikla izpostavljena pomanjkanju vode. Z evolucijo so rastline razvile različne mehanizme odziva na sušo, ki so tako raznoliki, kot so rastline, ki se srečujejo s takimi razmerami. Mnoge kulturne rastline so v času selekcije na večji pridelek izgubile lastnosti, ki omogočajo preživetje v skrajnih razmerah. Nekatere rastline, ki pa so v naravi redke, jih še vedno imajo in so zaradi svoje posebne strategije za preživetje v sušnih obdobjih izredno zanimive za preučevanje (Hieng in Kidrič, 2001).

Afriška vijolica in ramonda imata, kljub temu, da spadata v isto družino rastlin, popolnoma različen odziv na sušni stres. Prva pomanjkanje vode dlje časa tolerira, se proti njej boriti, kar se je pokazalo tudi pri našem raziskovalnem delu. Celotna rastlina se je posušila šele po približno treh mesecih brez vode. Listi so veneli in se ob stopnjevanju trajanja suše tudi posušili postopoma od zunanjih do tistih v sredini rozete. Izjemna je sposobnost rehidracije listov vijolic, saj so se še zelo uveli, na otip mehki in tanki listi, po zalitju rastline z vodo, sposobni dokaj hitro povrniti v »normalno« stanje. Afriška vijolica torej v suši precej dolgo vztraja, vendar če le-ta traja predolgo, na koncu zaradi strukturnih in funkcionalnih irreverzibilnih sprememb celic ni več sposobna rehidracije ter propade.

Oživitve sposobne rastline, med katere spada tudi ramonda, so že po svojem imenu sodeč, zmožne preživeti dolgotrajno popolno dehidracijo celične protoplazme brez trajnih poškodb. Odziv ramond na sušo je na videz sicer podoben kot pri rastlinah, ki ne tolerirajo pomanjkanja vode in v takih pogojih hitro propadejo. Pri ramondi, ki smo jo izpostavili suši, so se, v nasprotju z afriško vijolico, že samo po nekaj dneh nezalivanja vsi listi, razen čisto zunanjih, zvili v trd, suh tulec. Zdelenje se je, kot da je rastlina propadla. Njeno sposobnost ponovne oživitve smo potrdili z rehidracijo lista s te rastline. Le-ta je na omočenem papirju v petrijevki v enem dnevu ozelenel in dajal videz lista s kontrolne, redno zalivane rastline. Ramonde so zaradi svojih izjemnih lastnosti, ki so med višjimi

rastlinami zelo redke, z leti upravičeno postale pomemben model v fizioloških študijah in so veliko prispevale k dosedanjemu razumevanju mehanizmov tolerance na sušo, ki pa še vedno niso v celoti pojasnjeni.

Sušni stres pri rastlinah vodi do znatnih sprememb, tako v znižanju ali zvišanju ravni izražanja posameznih genov, kar se lahko posledično odrazi pri sintezi proteinov (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Pri preučevanju odzivov rastlin na sušo in iskanju ključnih proteinov na tem področju, so nam v veliko pomoč analize proteinskih profilov. V okviru moje diplomske naloge smo skušali s pomočjo 2-DE najti proteine s spremenjenim izražanjem, za katere smo predvidevali, da so vključeni v odziv rastline na sušo. Na podlagi različnega fiziološkega odziva ramode in afriške vijolice na sušo, smo predpostavili, da pride pri afriški vijolici do splošnega znižanja izražanja proteinov, pri ramondi pa do povečanega izražanja večjega števila proteinov oz. do morebitne sinteze novih proteinov.

Da so bili rezultati proteomskeih analiz relevantni, smo dali velik poudarek na ustrezeno pripravo bioloških vzorcev. Ker smo preučevali odziv rastlin na sušo, smo poskušali v največji meri izključiti morebitne ostale stresne dejavnike, zato smo rastline gojili v rastni komori s kontroliranimi pogoji. Ob pobiranju in shranjevanju listov smo določili vsebnost vode (VV) in relativno vsebnost vode (RVV), ki sta dopolnili naš vizualni opis stanja rastlin (Preglednica 11 in Preglednica 12). Zanimivo je dejstvo, da vrednost VV pri afriški vijolici iz začetnih skoraj 96 % pri kontroli in 86 % še v četrti fazì suše, pade v popolnoma suhih listih na 40 %, medtem ko pri ramondi pade iz 76 % pri kontroli, na 7 % pri suhi rastlini. Slednja VV je izredno nizka, toda ramonda je sposobna preživeti tudi tako hudo izsušitev vegetativnih tkiv. Poleg kontrolnih rastlin, ki smo jih redno zalivali, smo afriške vijolice izpostavili petim različno dolgim fazam suše (Preglednica 10). Le-te so se odražale tudi na morfologiji rastlin, ki se je med fazami precej razlikovala (Slika 2), do vidnih razlik v načinu odziva na sušo pa je prišlo tudi med obema rastlinskima vrstama. Pri preučevanju odziva ramonde na sušo smo bili omejeni z zelo majhnim številom rastlin, saj gre namreč za zaščiteno endemično rastlinsko vrsto. Zato smo poleg kontrole pridobili le vzorec popolnoma suhe ramonde, ki bi se po morfoloških lastnostih lahko še najbolj primerjala s peto fazo suše pri afriški vijolici. Razlike med obema rastlinskima vrstama so v času, ki ga

rastlina rabi, da se popolnoma posuši, v izgledu posušenih listov, največja pa se pokaže med rehidracijo, ko popolnoma suhi rastlini ponovno zalijemo – afriška vijolica ne kaže znakov življenja, ravno nasprotno pa pri ramondi opazimo hitro ozelenitev suhih listov (Dražič in sod., 1999).

V čem se torej fiziološki odziv ramonde razlikuje od fiziološkega odziva afriške vijolice, ki po približno treh mesecih boja vendarle podleže posledicam suše? Kot smo že omenili, smo odgovor iskali s pomočjo proteomske analize. Izvedli smo 2-DE proteinov ekstraktov listov v območju molekulske mase 10 – 220 kDa in pH območju 3 – 10. Proteinske profile kontrolnih vzorcev smo s pomočjo računalniškega programa primerjali s proteinskimi profili vzorcev rastlin izpostavljenih suši. S slik gelov ekstraktov afriških vijolic in ramond je razvidno, da so rezultati potrdili našo hipotezo. Razlike v odzivu obeh rastlinskih vrst na sušo namreč niso bile vidne samo pri njunem fiziološkem odzivu, temveč tudi na ravni proteoma. Tu je bila po pričakovanjih največja razlika med njima v stanju popolnoma suhih rastlin.

Pri afriški vijolici se skozi stopnjujoče faze suše kaže trend represije izražanja večine proteinov v primerjavi s kontrolo. To na slikah gelov od prve do četrte faze suše ni tako zelo izrazito, vendar nam je to potrdila analiza z računalniškim programom 2-D Dymension. Največjo razliko v proteinskem profilu smo zaznali med 4. fazo suše, ko se je rastlina še lahko rehidrirala (Slika 4E), in 5. fazo suše, ko je bila rastlina popolnoma suha in ni več ozelenela (Slika 4F). Pri slednjem smo opazili zelo malo 2-D elektroforetskih lis (v nadaljevanju lis), kar kaže na popoln kolaps v celicah. Na gelih je bilo le še nekaj proteinov, kar je najverjetneje posledica represija sinteze in tudi razgradnje proteinov. Med njimi je le nekaj izjem, pri katerih smo v 4. fazi suše opazili povišano izražanje (lise št. 1, 2, 3 in 4), v 5. fazi pa tudi pri njih opazimo represijo sinteze ali celo odsotnost. Afriška vijolica se očitno med relativno dolgim vztrajanjem v suši poslužuje številnih mehanizmov, ki sčasoma postanejo manj učinkoviti. To nam potrjujeta tudi identifikaciji dveh proteinov, pri katerih smo skozi prve štiri faze suše opazili povečano izražanje. Protein pod liso številka 4, je bil identificiran kot beta podenota proteasoma. Gre za velik proteinski kompleks v citosolu celic, ki skrbi za razgradnjo poškodovanih in predhodno z ubikvitinom označenih proteinov. Skozi faze suše opazna povišana sinteza omenjene

podenote proteasoma, bi lahko bila pokazatelj, da je v celicah veliko poškodovanih proteinov in da se učinkovitost ostalih obrambnih/popravljalnih mehanizmov zmanjšuje.

Identifikacija lise pod št. 1 kaže, da gre za encim pektin metilesterazo (PE). Predvidevamo, da je njegovo povečano izražanje v suši izpostavljenih listih afriških vijolic lahko na fiziološki ravni povezano z opaznim tanjšanjem listov. PE namreč razgrajuje pektine, kompleksne oligosaharide, ki so prisotni v vseh celičnih stenah rastlin (Micheli, 2001). Povišana sinteza tega proteina v končnih fazah suše bi lahko pripomogla k propadu listov.

O sposobnosti rastlin, ki med sušo zapadejo v anabiozo, prenesejo skoraj popolno izsušitev vegetativnih tkiv, med rehidracijo hitro »oživijo« ter o zaščitnih in popravljalnih mehanizmih, ki so vključeni v to, smo veliko pisali že v Pregledu objav. Z našim delom, opisanim v moji diplomske nalogi, smo deloma dopolnili znanje o izjemni lastnostih ramonde na področju proteomike. Proteinski profil ekstraktov suhih listov ramonde (Slika 11) se je namreč popolnoma razlikoval od proteinskega profila suhe afriške vijolice (Slika 4F). Medtem, ko je pri slednji represija sinteze večine proteinov zelo izrazita, je slika pri ramondi popolnoma obratna. Pri primerjavi proteinskih profilov ramonde z računalniškim programom smo opazili *de novo* sintezo velikega števila proteinov (št. lis 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 in 19, 20, 21, 22), pri nekaj proteinih je prišlo do znižanega izražanja (št. lis 1, 2, 3, 4, 5 in 6). Proteine, ki so na gelu označeni pod št. lis 20, 21 in 22, smo dodali med novo sintetizirane proteine v suši po naknadnem ročnem pregledu slik gelov. Iz omenjenih rezultatov lahko sklepamo, da ramondina zmožnost preživeti popolno dehidracijo zagotovo izhaja tudi iz dejstva, da je zmožna med tako izrednimi sušnimi razmerami obdržati večino proteinov oz. celo sintetizirati nove, ki sodelujejo v njenem specifičnem odzivu.

Identifikacija lise pod št. 20 na sliki gela vzorca ramonde v suši kaže, da gre za veliko podenoto proteina ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza (Rubisco). To je encim Calvinovega cikla, ki je se nahaja v kloroplastih in katalizira prvi korak fiksacije ogljika – proces vključevanja atmosferskega CO₂ v ogljikove hidrate. Predhodne raziskave (Degl'Innocenti, 2008) ramond so deloma osvetlile tudi to področje. Poročajo, da je asimilacija CO₂ med sušnim stresom omejena, saj se listne reže zaprejo. Med dehidracijo se pomembno zniža

tudi specifična aktivnost Rubisca, ki pa med rehidracijo zelo naraste, sčasoma pa pade na kontrolno raven. Aktivnost Rubisca se torej spreminja tekom dehidracije-rehidracije in ni v direktni povezavi z njegovo vsebnostjo. To bi lahko sklepali tudi na podlagi naših rezultatov. Omenjeni protein smo sicer na gelu sami označili kot novega, saj robni del slik gelov nismo mogli vključiti v računalniško obdelavo. Glede na znane informacije o Rubiscu, očitno ne gre za sintezo novega proteina kot odziv ramonde na sušo, kljub vsemu pa smo pokazali, da se vsaj njegova vsebnost v celicah takrat močno poviša. Ker je znano, da ima ta rastlina sposobnost takojšnje ponovne oživitve in s tem ozelenitve, si povečano vsebnost Rubisca razlagamo kot pripravo rastline na morebitno rehidracijo, kjer takojšnja fiksacija CO₂ pripomore k oživitvi. Poleg tega je znano tudi, da ramonda v listih med izsušitvijo obdrži tudi do 80 % klorofila, kar še dodatno pripomore, k čimprejšnji ponovni vzpostavitevi fotosinteze (Dražič in sod., 1999).

Zaradi finančno zahtevnih raziskav smo bili pri identifikaciji omejeni na deset 2-D elektroforetskih lis. Ker genom afriške vijolice in ramonde ni poznan, posledično tudi ni poznana proteinska mapa. Zato je bilo potrebno v postopku identifikacije iskati homologijo z že znanimi proteini rastlin, ki že imajo narejeno proteinsko mapo. Kot rezultat lahko le za tri od desetih v analizo poslanih proteinov predvidevamo njihovo identiteto – pri afriški vijolici sta to proteina pektinmetilesteraza in beta podenota proteasoma, pri ramondi pa encim Rubisco. Za preostale, ki imajo verjetno vlogo v odzivu rastlin na sušni stres, pa bi bila potrebna še nadaljnja analiza pridobljenih sekvenc z bioinformatskimi orodji, kar bi lahko vodilo do potrditve njihove identitete.

5.2 SKLEPI

- Način gojenja rastlin, izpostavitev sušnemu stresu in način vzorčenja so bili izvedeni optimalno, kar je vodilo k minimalnim razlikam med proteinskimi profili bioloških ponovitev rastlin.
- Vpliv suše se je odrazil na fizioloških lastnostih obeh vzorčnih rastlin, ki so se med fazami suše razlikovale. Afriška vijolica se je proti pomanjkanju vode dlje časa borila, vendar se je na koncu posušila. Pri ramondi smo opazili popolnoma drugačen odziv na sušo, saj je bil čas do suhe faze izrazito krajsi, listi pa so se v nasprotju z afriško vijolico zvili v tulec. V popolnoma suhem stanju sta obe rastlini izgledali kot propadli rastlini. Afriška vijolica v takem stanju ni bila zmožna ponovne oživitve, z rehidracijo lista ramonde pa smo dokazali, da je bila ramonda tudi po izsušitvi svojih tkiv sposobna ponovne oživitve.
- V zadnji fazi suše, ko sta bili torej obe vzorčni rastlinski vrsti suhi, so se velike razlike pokazale pri njunih vsebnostih vode in relativnih vsebnostih vode.
- V fazi popolne izsušitve smo opazili znatne razlike v spremembah proteinskih profilov obeh rastlin. Pri afriški vijolici je tekom faz suše prišlo do znižanja izražanja večine proteinov v primerjavi z zalivanimi kontrolnimi rastlinami. Pri ramondi pa je suša povzročila *de novo* sintezo večjega števila proteinov v primerjavi s kontrolno rastlino.
- Identificirati smo uspeli 3 od 10 proteinov poslanih na identifikacijo, saj gre verjetno za zelo specifične proteine. Posledično nismo našli homologije z do sedaj znanimi proteini v rastlinah. Za preostale, ki imajo vlogo v odzivu rastlin na sušni stres, pa bi bila potrebna še nadaljnja analiza pridobljenih sekvenc z bioinformatskimi orodji.

6 POVZETEK

Večina rastlin je tekom svojega življenjskega obdobja izpostavljena različnim vplivom okolja. Da lahko preživijo, so tekom evolucije razvile obrambne mehanizme, ki so tako različni, kot so rastline, ki se soočajo z njimi. Pomanjkanje vode predstavlja enega najpogostejših in najškodljivejših abiotskih stresov za rastline, saj je voda ključnega pomena za rast in razvoj rastlin.

Vse rastline se večji ali manjši meri odzovejo na pomanjkanje vode, vendar v hudi suši vztrajajo in preživijo le nekatere rastlinske vrste. Do razlik v toleranci na sušo prihaja celo med rastlinskimi vrstami znotraj iste družine rastlin. Primer iz družine gesnerjevk sta afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) ter ramonda (*Ramonda serbica* Panč.), ki sta bili predmet naše raziskave v okviru te diplomske naloge. Afriška vijolica je homoiohidrična rastlina in ima sposobnost uravnavanja vsebnosti vode v svojih vegetativnih tkivih, ramonda pa te sposobnosti nima, zato jo uvrščamo med poikilohidriče rastline. Po svojem odzivu na sušni stres se povsem razlikujeta.

V diplomskem delu smo preučevali, kako sušni stres vpliva na proteom teh dveh rastlinskih vrst. Velik poudarek smo dali na ustrezno pripravo biloških vzorcev. Afriške vijolice smo preučili v petih različno dolgih fazah suše (1. faza – 10 dni, 2. faza – 20 dni, 3. faza – 35 dni, 4. faza – 64 dni, 5. faza – 3 meseci), ramondo pa zaradi omejenega dostopa rastlin le v eni fazi suše (19 dni). Kontrolo so pri obeh rastlinskih vrstah predstavljale redno zalivane rastline. Naš vizuelni opis stanja rastlin smo dopolnili z določitvijo vsebnosti vode in relativne vsebnosti vode v listih.

Afriška vijolica je v pomanjkanju vode vztrajala skoraj tri mesece, na koncu se je posušila in propadla. Pri ramondi je bil čas do suhe faze izrazito krajši. V stanju popolne izsušitve vegetativnih tkiv sta obe izgledali kot propadli rastlini. Afriška vijolica v takem stanju ni bila zmožna ponovne ozelenitve, z rehidracijo lista ramonde pa smo dokazali, da bi bila ramonda tudi po izsušitvi svojih tkiv sposobna ponovne oživitve.

Proteine celičnih ekstraktov listov rastlin, vzorčenih v vseh fazah suše, smo analizirali z 2-D elektroforezo v območju 10 – 220 kDa in območju pH = 3 - 10. Proteinske profile kontrolnih in suši izpostavljenih vzorcev smo primerjali med sabo z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Razlike v 2-D elektroforetskih lisah so bile ugotovljene s statistično analizo (t-test). Rezultati analiz kažejo, da obstajajo pomembne razlike v odzivu omenjenih rastlinskih vrst na sušni stres na ravni proteoma.

Pri afriški vijolici se je stopnjevanje suše kazalo na splošnem zniževanju izražanja proteinov v primerjavi z zalivanimi kontrolnimi rastlinami. Pri ramondi je suša povzročila *de novo* sintezo večjega števila proteinov v primerjavi s kontrolno rastlino. Največje razlike v spremembah proteinskih profilov obeh rastlin smo opazili v fazi popolne izsušitve. Sposobnost ramond, da lahko preživijo popolno dehidracijo torej zagotovo izhaja tudi iz dejstva, da je zmožna med tako izrednimi sušnimi razmerami, v nasprotju z afriško vijolico, obdržati večino proteinov nerazgrajenih oz. celo sintetizirati nove, ki sodelujejo v njenem specifičnem odzivu.

Z namenom identificirati vsaj nekatere proteine v 2-D elektroforetskih lisah, ki afriški vijolici omogočajo dolgo vztajanje v suši ter tiste, ki ramondi omogočijo ponovno oživitev, smo potenciano zanimive proteine izrezali iz gelov in jih poslali na analizo z masno spektrometrijo. Identificirati smo uspeli nekaj potencialno zanimivih proteinov (3 od 10 proteinov poslanih na identifikacijo), saj gre verjetno za zelo specifične proteine. Pri afriški vijolici smo identificirali beta podenoto proteasoma ter encim pektin metilesterazo (PE), pri ramondi pa protein Rubisco.

7 VIRI

Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E. 1992. Ethylene in plant biology. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 414 str.

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidati v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Alpert P. 2006. Constraints of tolerance: Why are desiccation tolerant organism so small ar rare. Journal of Experimental Botany, 209: 1575-1584

Augusti A., Scartazza A., Navari-Izzo F., Sgherri C.L.M., Stevanović B., Brugnoli E. 2001. Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. Photosynthesis Research, 67: 79-88

Bartels D., Salamini F. 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. Plant Physiology, 127: 1346-1353

Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 167 str.

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. 2. izd. Ljubljana, Študentska založba: 48-48, 79-82

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254

Bray E.A. 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science, 2, 2: 48-53

Bray E.A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during waterdeficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant, Cell and Environment*, 25:153-161

Brzin J., Kidrič M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and response to various stress conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13: 422-467

Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. 2005. Preparations of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5: 2497-2507

Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H.V., Engel K.H., Cooper K., Farrant J.M. 2002. Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: Protection versus repair. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1805-1813

Cutler A.J., Krochko J.E. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4: 472–478

Degl'Innocenti E., Guidi L., Stevanovic B., Navari F. 2008. CO₂ fixation and chlorophyll a fluorescence in leaves of *Ramonda serbica* during a dehydration–rehydration cycle. *Journal of Plant Physiology*, 165: 723—733

Ditzer A., Bartels D. 2006. Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulon and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 LEA gene CpC2 from *C. plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, 61: 643-663

Dražić G., Mihailović N., Stevanović B. 1999. Chlorophyll metabolism in leaves of higher poikiloydric plants *Ramonda sebica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et. Petrov. during dehydration and rehydration. *Plant Physiology*, 154: 379-384

Dure L., Crouch M., Harada J., Ho T-H.D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z. R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12: 475–486

Elster R. 2004. Untersuchung zum Zuckerstoffwechsel der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* und einiger Lindernia-Arten. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=971675287&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=971675287.pdf: 131 str.

Farrant J.M. 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151: 29-39

Gaff D.F. 1989. Responses of desiccation tolerant »resurrection« plants to water stress. V: Structural and functional responses to environmental stresses. Kreeb K.H., Richter H., Hinckley T.M. (eds). The Hague, SPB Academic Publishers: 255-268

Görg A. 1992. Two-dimensional electrophoresis. *Nature*, 349: 545-546

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W. 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 20: 712–717

Hashimoto M., Kisilevka L., Sawa S., Furukawa T., Komatsu S., Koshiba T. 2004. A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiology*, 45, 5: 550-559

Hernandez L.E., Cooke D.T. 1997. Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. Journal of Experimental Botany, 48: 1375-1381

Hieng B., Kidrič M. 2001. Ramonde: rastline, sposobne oživitve. Proteus, 8, 63: 344-350

Hisao T.C. 1973. Plant responses to water stress. Annual Reviews of Plant Physiology, 24: 519-570

Hrovat A., Vrecl M. 2008. Biološki vzorci – vzorčenje in priprava. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. jan. in 1. feb. 2008. Raspor P., Jammik P. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-18

Ingle R.A., Schmidt U.G., Farrant J.M., Thomson J.A., Mundree S.G. 2007. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. Plant, Cell and Environment, 30: 435-446

Ingram J., Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Reviews of Plant Physiology, 47: 377-403

Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2007. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. Molecular Breeding, 21: 159-172

Kiyosue T., Beetham J.K., Pinot F., Hammock B.D., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1994a. Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. Plant Journal, 6, 2: 259–269

Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1994b. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. Plant Molecular Biology, 25: 791–98

Komel R., Kastelic D., Kočevar N., Rajčevič U. 2008. Proteomika v medicinskih raziskavah in diagnostiki. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. jan. in 1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-44

Križaj I. 2008. Metoda za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. jan. in 1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31

Longman D. 1986. Nega sobnih rastlin z nazornimi ilustracijami. Ljubljana, Mladinska knjiga: 158-158

Luo M., Lin L., Hill R.D., Mohapatra S.S. 1991. Primary structure of an environmental stress and abscisic acid-inducible alfalfa protein. Plant Molecular Biology, 17: 1267–1269

Mandelc S. 2008. Vaje za rastlinsko biotehnologijo – interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 10 str.

Markovska Y.K., Tutekova A.A., Kimenov G.P. 1995. Ultrastructure of chloroplasts of poikilohydrous plants *Haberlea rhodopensis* Friv. and *Ramonda serbica* Panč. during recovery from desiccation. Photosynthetica, 31: 613-620

McKersie B.D., Leshem Y.L. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 148-180

McMichael B.L., Jordan W.R., Powell R.D. 1972. An effect of water stress on ethylene production by intact cotton petioles. *Plant Physiology*, 49: 658-660

Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6, 9: 414-419

Moore R., Clark D.W., Vodopich D.S. 1998. *Botany*. 2nd ed. New York, McGraw-Hill: 497-520

Moradas Ferreira P., Costa V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxigen species: Defence, demage and death. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 5, 5: 277-285

Müller J., Sprenger N., Bortlik K., Boller T., Wiemken A. 1997. Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. *Physiologia Plantarum*, 100: 153-158

Mužerlin A. 2009. Vpliv pomanjkanja vode na proteolitično aktivnost v listih ramonde in afriške vijolice. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 32-35, 79-82

Navari-Izzo F., Rascio N. 1999. Plant response to water-deficit conditions. V: *Handbook of plant and crop stress*. Pessarakli M. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc: 231-270

Noteborn H.P.J.M., Pedersen J., Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1089–1125

O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 250(10): 4007-4021

Oliver M.J., Bewley J. 1997. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Horticultural Reviews*, 18: 171-214

Quartacci M.F., Glišić O., Stevanović B., Navari-Izzo F. 2002. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, 53, 378: 2159-2166

Robertson M., Chandler P.M. 1992. Pea dehydrins: Identification, characterisation and expression. *Plant Molecular Biology*, 19:1031–44

Rodrigo M.J., Bockel C., Blervacq A.S., Bartels D. 2004. The novel gene CpEdi-9 from the resurrection plant *C. plantagineum* encodes a hydrophilic protein and is expressed in mature seeds as well as in response to dehydration in leaf phloem tissues. *Planta*, 219: 579–589

SABiosciences. 2000. Ubiquitin-proteasome dependent proteolysis. Frederick, SABiosciences Corporation, A Qiagen Company.

[http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Ubiquitin-Proteasome Dependent Proteolysis](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Ubiquitin-Proteasome+Dependent+Proteolysis) (10. 5. 2010): 3 str.

Sasaki-Sekimoto Y., Taki N., Obayashi T., Aono M., Matsumoto F., Sakurai N., Suzuki H., Yokota Hirai M., Noji M., Saito K., Masuda T., Takamiya K., Shibata D., Ohta H. 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 44: 653-668

Sgherri C., Stevanović B., Navari-Izzo F. 2004. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, 122: 478-485

Sherwin H.W., Farrant J.M. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation*, 24: 203-210

- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 1999. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115: 327–334
- Siljak-Yakovlev S., Stevanovic V., Tomasevic M., Brown S.C., Stevanovic B. 2007. Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: Cytogeography of living fossils. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 101-112
- Singh S., Cornilescu C.C., Tyler R.C., Cornilescu G., Tonelli M., Lee M.S., Markley J.L. 2005. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science*, 14: 2601–2609
- Stevanović B., Janković M.M. 2001. Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka. Beograd, NNK Internacional: 7-68, 200-205, 230-232
- Stevanović B., Šinžar J., Glišić O. 1997. Electrolyte leakage differences between poikilohydrous and homoiohydrous species of Gesneriaceae. *Biologia Plantarum*, 40, 2: 299-303
- Stevanović B., Thu. P.T.A., De Paula F.M., Da Silva J.V. 1991. Effects of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. *Canadian Journal of Botany*, 70: 107-113
- Swire-Clark G.A., Marcotte W.R. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology*, 39: 117–128
- Šircelj H. 2008. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91, 1: 271-282
- Taiz L., Zeiger E. 2006. Proteins required for desiccation tolerance: Topic 23.4. V: Plant physiology on line. 4th ed. Sunderland, Sinauer Associates.
<http://4e.plantphys.net/article.php?ch=7&id=7>: 1 str.

Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Sunderland, Sinauer Associates: 33-45,
540-556

Toth S., Scott P., Sorvari S., Toldi O. 2004. Effective and reproducible protocols for in vitro culturing and plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. Plant Science, 166: 1027-1034

Virant-Klun I. 1993. Odpornost koruze (*Zea mays* L.) kultivarjev »Dea« in »Carla« na pomanjkanje vode. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 22-40

Živković T., Quartacci M.F., Stevanović B., Marinone F., Navari-Izzo F. 2005. Low-molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. Plant Science, 168: 105-111

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Poloni Jamnik za vodenje, potrežljivost in mnoge nasvete. S svojo toplino in vzpodbudnimi besedami ste mi znali približati raziskovalno delo in ga narediti zanimivega. Hvala za čas, ki ste ga namenili meni in izdelavi moje diplomske naloge. Zelo sem vam hvaležna!

Zahvaljujem se tudi somentorici dr. Marjetki Kidrič. S svojo zavzetostjo in natančnostjo ste postavili trdne temelje raziskovalnemu delu v okviru tega diplomskega dela. Hvala vam za vso skrb in temeljito pregled diplomske naloge.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću.

Hvala Branki Stevanović za ramondi, saj ste nam s tem omogočili izvedbo naših raziskav.

Katji in Teji se zahvaljujem za pomoč v laboratoriju.

Hvala g. Rogerju Painu za lektoriranje angleškega povzetka.

Zahvala gre tudi ga. Ivici Hočevar za pregled in urejanje literarnih virov.

Zahvaljujem se tudi Urški. Samo ti zares veš, kolikokrat sem zmogla iti naprej prav s twojo pomočjo. Neizmerno sem ti hvaležna za vse kar sva preživel skupaj od otroških let naprej.

Prav posebna zahvala pa je namenjena mojim staršem, Blažu in Pavlu. Brez vaše neomajne ljubezni, podpore in zaupanja vame bi bila moja pot mnogo težja! Hvala vam!

PRILOGE

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

