

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Teja ŠIREC

**PROTEOM JEČMENOVIH KORENIN (*Hordeum vulgare*) IN ODGOVOR
RASTLINE NA POVEČANO SLANOST**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PROTEOME OF BARLEY ROOTS (*Hordeum vulgare*) AND RESPONSE
OF THE PLANT TO SALINITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Facolta' di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Universita' degli Studi di Napoli Federico II, Italija.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico imenovala prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina Gunde – Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentor: prof. dr. Sergio Esposito
Universita' degli Studi di Napoli Federico II, Facolta' di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale

Datum zagovora: 5. 11. 2009

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji. Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Teja Širec

Ključna dokumentacijska informacija

ŠD Dn

DK 581.1:582.542(043.2)=163.6

KG slanost / ječmen / *Hordeum vulgare* / dvo-dimenzionalna elektroforeza

AV ŠIREC, Teja

SA REGVAR, Marjana (mentor) / ESPOSITO, Sergio (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2009

IN PROTEOM JEČMENOVIH KORENIN (*Hordeum vulgare*) IN ODGOVOR RASTLINE
NA POVEČANO SLANOST

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP IX, 57 str., 4 pregl., 10 sl., 0 pril., 74 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI

Abiotiski stres pogosto pogojuje rast rastlin in produktivnost pridelovalnih površin. Sem prištevamo tudi povišane vrednosti vodotopnih soli v tleh, katere nižajo osmotski potencial prsti in s tem rastlinam otežujejo privzem vode. Povzročajo tudi ionsko neravnovesje, saj porušijo razmerje Na^+ in K^+ ionov ter otežujejo privzem nekaterih nutrientov. S pomočjo dvo-dimenzionalne elektroforeze smo želeli beležiti spremembe v izražanju proteinov ter poiskati proteine, ki sodelujejo pri odgovoru na slanost. Po primerjavi gela, na katerega smo nanesli vzorec korenin ječmena (*Hordeum vulgare*), izpostavljenih 500 mM NaCl za 6 ur s kontrolnim gelom, smo našli 39 proteinov, ki bi lahko sodelovali pri odgovoru na slanost. Te smo razvrstili v pet funkcionalnih kategorij, in sicer proteini, povezani z energijskim metabolizmom, asimilacijo dušika, regulacijo rasti in ekspanzije, kontrolo in popravljanjem škode ter z vzdrževanjem homeostaze.

Key words documentation

DN Dn

DC 581.1:582.542(043.2)=163.6

CX salinity / barley / *Hordeum vulgare* / two-dimensional electrophoresis

AU ŠIREC, Teja

AA REGVAR, Marjana (supervisor) / ESPOSITO, Sergio (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI PROTEOME OF BARLEY ROOTS (*Hordeum vulgare*) AND RESPONSE OF THE
PLANT TO SALINITY

DT Graduation thesis (University studies)

NO IX, 57 p., 4 tab., 10 pic., 0 app., 74 lit.

LA sl

AL sl / en

AB

Abiotic stress is often limiting plant growth and yield productivity. One of abiotic stress factors are excessive amounts of soluble salts in soil, which lower soil osmotic potential and make it harder for plants to take up water. Salinity leads to ionic disequilibrium by altering Na^+/K^+ ratio and nutrient uptake. We used two-dimensional electrophoresis for monitoring differences in protein patterns under high salinity (500 mM NaCl for 6 hours). Comparison of gel under experimental conditions to control gel of barley root extracts (*Hordeum vulgare*) revealed 39 proteins that could be involved in response to salinity. They fit in five functional classes; proteins, connected to energy metabolism, nitrogen assimilation, growth and expansion regulation, control and damage repair and homeostasis.

Kazalo vsebine

1 UVOD.....	1
2 HIPOTEZE.....	2
3 PREGLED OBJAV.....	3
3.1 SLANOST.....	3
3.1.1 Vzroki salinizacije.....	3
3.2 POVIŠANA SLANOST V TLEH.....	4
3.3 TOLERANCA RASTLIN NA SLANOST.....	4
3.3.1 Ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>).....	5
3.4 PROBLEMATIKA IN SIMPTOMI OSMOTSKEGA IN IONSKEGA STRESA.....	6
3.4.1 Fiziologija osmotskega in ionskega stresa na nivoju organizma.....	6
3.4.2 Fiziologija osmotskega in ionskega stresa na celični ravni.....	6
3.4.3 Občutljivost tkiv na Na ⁺	7
3.5 STRATEGIJE ZA IZBOLJŠANJE TOLERANCE NA SLANOST.....	7
3.5.1 Zaznavanje slanosti.....	7
3.5.2 Privzem natrija v koreninska tkiva.....	8
3.5.3 Izločanje natrija iz koreninskih tkiv.....	8
3.5.4 Celična kompartmentizacija.....	8
3.5.5 SOS signalna pot.....	9
3.5.6 Osmoliti in osmoprotektanti.....	10
3.5.7 Fotosinteza in stomatalna prevodnost.....	10
3.5.8 Reaktivne kisikove zvrsti (RKZ).....	10
3.5.9 Programirana celična smrt (PCS).....	11
3.6 PROTEOMIKA IN DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA.....	12
3.7 PROTEOMSKE RAZISKAVE.....	13
4 MATERIAL IN METODE.....	15
4.1 KULTIVACIJA RASTLIN.....	15

4.2 EKSTRAKCIJA PROTEINOV S TRIKLOOROOCETNO KISLINO (TCA) IN ACETONOM (Conte in sod., 2007).....	16
4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	17
4.4 REHIDRACIJA IPG-TRAKOV	18
4.5 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	18
4.6 URAVNOTEŽENJE TRAKOV	19
4.7 SDS - PAGE.....	20
4.8 BARVANJE S SREBROVIM NITRATOM	20
4.9 SHRANJEVANJE GELOV	21
4.10 OBDELAVA PODATKOV.....	21
5 REZULTATI.....	25
5.1 EKSTRAKCIJA PROTEINOV	25
5.2 OPTIMIZACIJA DELOVNEGA PROTOKOLA	25
5.2.1 Optimizacija protokola za ekstrakcijo proteinov.....	25
5.2.2 Optimizacija dvo-dimenzionalne elektroforeze.....	26
5.3 PROTEOMSKE ANALIZE.....	29
6 DISKUSIJA.....	34
6.1 OPTIMIZACIJA DELOVNEGA PROTOKOLA	34
6.2 ODGOVOR JEČMENOVIIH KORENIN NA POVEČANO SLANOST.....	36
6.2.1 Kategorije proteinov.....	36
6.2.2 Proteini, povezani z energijskim metabolizmom	37
6.2.3 Proteini, povezani z asimilacijo dušika.....	39
6.2.4 Proteini, povezani z vzdrževanjem celične homeostaze	40
6.2.5 Proteini, ki sodelujejo pri kontroli in popravljanju škode.....	42
6.2.6 Proteini, ki sodelujejo pri regulaciji rasti in ekspanzije	43
7 POVZETEK	46
8 LITERATURA.....	47
9 ZAHVALA.....	57

Kazalo tabel

Tabela 1: Kategorije rastlin glede na sposobnost toleriranja slanosti (Blayoc, 1994).....	4
Tabela 2: Sestava hidroponske raztopine	15
Tabela 3: Približne molekulske mase in izoelektrične točke markerskih proteinov.....	22
Tabela 4: Pregled proteinov, za katere na podlagi naših podatkov predvidevamo, da so se izrazili v ječmenovih koreninah pod vplivom povišane slanosti.....	31

Kazalo slik

Slika 1: Diverziteta tolerance na slanost pri različnih rastlinah.....	5
Slika 2: SOS signalna pot	9
Slika 3: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu	17
Slika 4: Gel z markerskimi proteini M1 (amiloglukozidaza), M2 (ovalbumin), M3 (karbonska anhidraza) in M4 (mioglobin). S puščicama sta označeni mesti kontaminacije.....	22
Slika 5: Umeritvena krivulja za izoelektrično točko (pI) za kontrolni gel.....	23
Slika 6: Umeritvena krivulja za molekulsko maso (MW) za kontrolni gel.....	24
Slika 7: Gel; nanесли smo 50 µg proteinov.....	27
Slika 8A in 8B: Gel, kjer so se slabo ločili proteini z izoelektrično točko pri zelo kislem pH-ju in pri zelo bazičnem pH-ju (8A) in primer dobro ločenega gela (8B).	28
Slika 9A in 9B: Kontrolni gel (9A), gel; vzorec, izpostavljen 500 mM NaCl za 6 ur (9B).....	30
Slika 10: Diagram, ki prikazuje relativni delež funkcionalnih skupin, katerim bi po svojih lastnostih lahko pripadali najdeni proteini.	33

Okrajšave in simboli

2-DE – dvo-dimenzionalna elektroforeza

EC_e - električna prevodnost

RKZ – reaktivne kisikove zvrsti

ABA – abscizinska kislina

PCS – programirana celična smrt

pI – izoelektrična točka

MW – molekulska masa

IEF – izoelektrično fokusiranje

ddH₂O – bidistilirana voda

DTT – ditioneitol

JAA - jodoacetamid

TEMED – tetrametiletilendiamin

TCA – trikloroocetna kislina

BSA – goveji serumski albumin

R_f – relativna mobilnost

Tris HCl - 2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol, hidroklorid

MS – masna spektrometrija

1 UVOD

V raziskavi smo se osredotočili na ječmen (*Hordeum vulgare*), pomembno kulturno rastlino. Uporabljajo ga predvsem za krmljenje živali, pomemben je tudi v humani prehrani in pivovarski industriji.

Ena izmed zaskrbljujočih dejstev, s katero se spopada vedno več poljedelcev po svetu, so visoke koncentracije soli v tleh, ki so vzrok zmanjšani produktivnosti polj. Namakana področja so še posebno izpostavljena tveganju salinizacije, kar vodi v progresivno krčenje obdelovalnih površin. Ogrožena so tudi območja, ki so izpostavljena občasnim poplavljanjem morij kot posledica naravnih katastrof (tsunamiji) ali višanja nivoja morske gladine (nekatera območja na Nizozemskem).

Natrijev klorid (NaCl) je najbolj zastopana in najbolj topna sol v tleh, zato se bomo osredotočili na odgovor rastline na NaCl in na mehanizme tolerance na natrijev kation, ki je najpogostejši vzrok ionsko - specifičnih poškodb za mnoge rastline, med drugim tudi za žitarice. Omejili se bomo na korenine kalic ječmena, saj so le-te neposredno izpostavljene povišanim vrednostim soli in zato predstavljajo primarno mesto kontrole privzema NaCl. Kalica predstavlja najbolj občutljiv razvojni stadij na slanost (Walia in sod., 2006).

V tem delu bomo pogosto uporabljali izraz stres, s katerim se nanašamo na nek dejavnik okolja, ki moti normalno delovanje fizioloških procesov (Munns in Tester, 2008).

Namen tega raziskovalnega dela je preučiti odgovor ječmena na slanost v prid agro – prehrambeni industriji. Želeli smo opazovati odgovor rastline na tovrstni stres pri ekstremnih pogojih (500 mM NaCl). Hoteli optimizirati dvodimenzionalno elektroforezo za proteomske analize.

2 HIPOTEZE

Oblikovali smo naslednje delovne hipoteze:

1. Z dvo-dimenzionalno elektroforezo bomo lahko ločili proteine, ki so zastopani v ječmenovih koreninah.
2. Pričakujemo spremembe v izražanju proteinov kot odgovor na povišano slanost.
3. Pričakujemo indukcijo proteinov, povezanih z vzdrževanjem homeostaze, regulacije rasti in ekspanzije ter kontrolo in popraviljanjem škode (povzeto po Zhu, 2002).

3 PREGLED OBJAV

3.1 SLANOST

Povišana slanost v prsti je ena izmed najpogostejših abiotских dejavnikov, ki občutno zmanjšujejo produktivnost polj in kvaliteto pridelka. Več kot 6 % celotne Zemljine površine vsebuje prekomerne koncentracije soli. Agrikulture površine, predvsem namakana polja, so še posebej izpostavljena salinizaciji; predstavljajo le 15 % vseh pridelovalnih površin, vendar zaradi svoje visoke produktivnosti proizvedejo kar tretjino svetovne hrane (Munns in Tester, 2008).

3.1.1 Vzroki salinizacije

Salinizacija je proces kopičenja vodotopnih soli v tleh. Skozi dolga obdobja se predvsem v suhih in semi-suhih področjih akumulirajo soli, ki izvirajo iz preperelih kamnin. Tudi odlaganje morskih soli, ki jih raznašata dež in veter, doprineseta k povečani slanosti v prsti. Poleg zgoraj naštetih naravnih, omenimo še antropogene vzroke salinizacije. Mednje štejemo predvsem slabo upravljanje s pridelovalnimi površinami. Voda za namakanje slabe kvalitete pogosto vsebuje povišane vrednosti soli. Predvsem v suhih in semi-suhih področjih, voda hitro izpareva in zato ne spira soli globlje v profil, kar vodi v akumulacijo soli (Szabolcs, 1989).

S problemom salinizacije se je potrebno spopasti z več nivojev. Potrebno bi bilo spremeniti upravljanje z agrokulturnimi površinami in uporabljati kvalitetno vodo za namakanje (z nizko vsebnostjo soli) in izboljšati toleranco rastlin na slanost z udomačevanjem divjih tolerantnih variant ali z gensko manipulacijo (Tester in Davenport, 2003).

3.2 POVIŠANA SLANOST V TLEH

Prst lahko definiramo kot slano prst, kadar ima električno prevodnost (EC_e) več kot 4 dS m^{-1} , kar je primerljivo s 40 mM raztopino NaCl (Chinnusamy in sod., 2005). Električna prevodnost je sposobnost neke snovi prevajati električni tok. Ioni v raztopini prevajajo elektriko, zato lahko ocenimo vsebnost ionov v prsti z merjenjem električne prevodnosti vodnega ekstrakta prsti. EC_e merimo kot prevodnost preko znane razdalje: deci-Siemens na meter ali dS m^{-1} . Soli z visoko vrednostjo EC_e so slane (Walworth, 2006). Soli, ki jih lahko najdemo v prsteh so predvsem natrijevi, kalcijevi in magnezijevi kloridi, v manjši meri pa tudi razni sulfati in karbonati (Szabolcs, 1989).

3.3 TOLERANCA RASTLIN NA SLANOST

Rastline lahko razdelimo v štiri kategorije glede na občutljivost oziroma sposobnost tolerance na soli (tabela 1), kar se kaže v relativnem deležu padca produktivnosti (Blayoc, 1994).

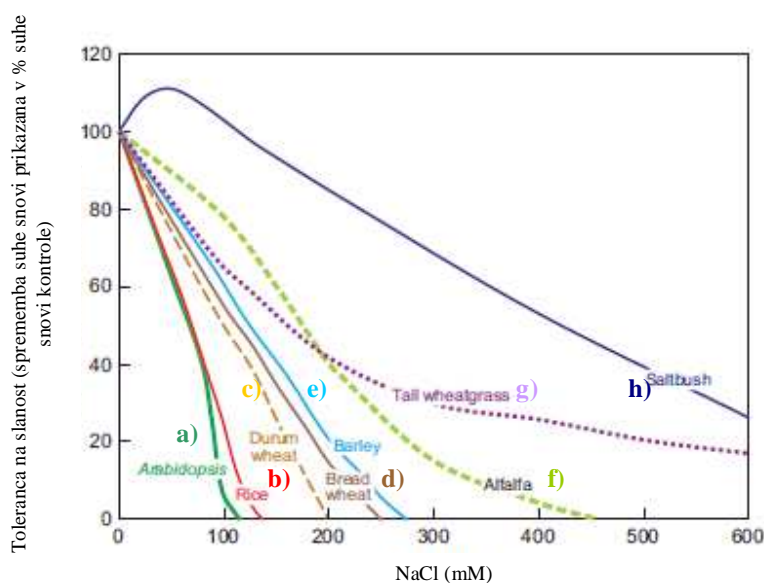
Tabela 1: Kategorije rastlin glede na sposobnost toleriranja slanosti (Blayoc, 1994).

Razred rastlin glede na toleranco na slanost	Pričakovan padec produktivnosti [%]			
	0	25	50	100
	Slanost prsti [EC_e , dS/m]			
Občutljive	≤ 1.3	1.4 - 2.7	2.6 - 4.2	≥ 8.0
Zmerno občutljive	≤ 3.0	2.7 - 6.6	4.2 - 9.5	≥ 16.0
Zmerno tolerantne	≤ 6.0	6.3 - 10.5	9.5 - 15.0	≥ 24.0
Tolerantne	≤ 10.0	10.5 - 15.5	15.0 - 21.0	≥ 32.0

3.3.1 Ječmen (*Hordeum vulgare*)

Ječmen je enoletnica iz družine trav (*Poaceae*). Je eno najstarejših žit, ki so jih gojili že v mlajši kameni dobi, verjetno že 6000 let pr. n. št. Izvira iz osrednje Azije in Etiopije. Je pomembna kulturna rastlina, saj ga uporabljajo v različne namene. Največji pomen ima kot surovina v pivovarski industriji. Zrnje, moka in otrobi gojenega ječmena imajo visoko hranilno vrednost in so uporabni tako v humani prehrani kot tudi krmilo za vse vrste živine in perutnine, saj ugodno vpliva na kvaliteto mesa (Leksikon rastlinskih bogastev, 1993).

Ječmen je od vseh žit najbolj odporen na nekatere abiotične dejavnike, kot sta mraz in slanost. Glede na sposobnost toleriranja povišane slanosti v prsti sodi v razred zmerno tolerantnih rastlin. Spodnja slika prikazuje raznolikost sposobnosti tolerance na slano okolje nekaterih kulturnih rastlin.



Slika 1: Diverzitetna tolerance na slanost pri različnih rastlinah je prikazana kot razmerje med povečanjem suhe mase poganjkov po vsaj 3-tedenskem gojenju rastlin v NaCl raztopini in povečanjem suhe mase poganjkov v odsotnosti NaCl. Podatki se nanašajo na a) navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), b) riž (*Oryza sativa*), c) trdo pšenico (*Triticum turgidum* sp. *Durum*), d) pšenica (*Triticum aestivum*), e) ječmen (*Hordeum vulgare*), f) lucerna (*Medicago sativa*), g) podaljšana pirnica (*Agropyron elongatum*) in h) *Atriplex amnicola* (Munns in Tester, 2008).

3.4 PROBLEMATIKA IN SIMPTOMI OSMOTSKEGA IN IONSKEGA STRESA

3.4.1 Fiziologija osmotskega in ionskega stresa na nivoju organizma

Slanost prizadene rastline na dveh nivojih. Visoke vsebnosti soli v prsti porušijo osmotsko ravnovesje in otežujejo privzem vode. Simptomi osmotskega stresa, vidni na makro morfološkem nivoju so uvelost in zaviranje rasti poganjkov in korenin. Odgovor rastline je hiter, opazen po nekaj urah.

Ionsko neravnovesje pa povzroča citotoksičnost, saj moti delovanje encimskih procesov. Simptomi ionskega stresa se kažejo kot senescenca in nekroza starejših listov, ki se začneja na konicah in robovih in se širi proti notranjosti listov, kar je posledica progresivne akumulacije Na^+ v listih (Tester in Davenport, 2003). Odgovor je počasen, opazen po nekaj dneh.

3.4.2 Fiziologija osmotskega in ionskega stresa na celični ravni

Rastline morajo vzdrževati notranji vodni potencial pod potencialom prsti, da lahko privzemajo vodo in ohranjajo turgor. Če je situacija obratna, korenine ne morejo privzemati vode in/ali jo celo izgubljajo, kar vodi v dishidracijo rastline, otežuje pa tudi mnoge fiziološke procese kot so transpiracija, odpiranje stom, rast, ... (Chinnusamy in sod., 2005)

Ionska komponenta povzroča citotoksičnost, ker poruši ionsko ravnovesje v celici. Prihaja do zamenjave natrijevih ionov s kalijevimi v biokemijskih reakcijah, konformacijskih sprememb in izgube aktivnosti proteinov, s katerimi Na^+ in Cl^- tekmujeta za hidrationski ovoj in interferirata z nekovalentnimi interakcijami med amino kislinami (Chinnusamy in sod., 2005). Visoko razmerje ionov Na^+ in K^+ lahko torej poruši različne encimske procese v citosolu, saj Na^+ in K^+ tekmujeta za esencialna mesta pri raznih celičnih funkcijah (Tester in Davenport, 2003).

Metabolno neravnovesje, ki ga povzročajo ioni, osmotski stres in pomanjkanje nutrientov lahko vodijo v oksidativni stres. Med drugim lahko povišane koncentracije Na^+ prizadenejo privzem nutrientov, saj Na^+ interferira s transporterji v plazemski membrani korenin in zavira rast korenin (Tester in Davenport, 2003).

3.4.3 Občutljivost tkiv na Na^+

Listi so bolj občutljivi na Na^+ kot korenine, saj se le-ta nalaga v večjih koncentracijah v nadzemnih delih rastlin. In sicer, Na^+ potuje po rastlini po ksilemu s pomočjo transpiracijske sile. Ko voda izhlapi, Na^+ ostane v rastlini, kar vodi v progresivno kopičenje Na^+ v listnih tkivih (Tester in Davenport, 2003). Korenine so sposobne uravnati količino Na^+ , saj imajo mehanizme izločanja odvečnega Na^+ v prst, ali pa ga pošiljajo v liste. Na prisotnost povišanih vrednosti soli so še posebej občutljive meristemske celice, saj v le-teh ni velikih vakuol, kamor bi lahko skladiščile toksične ione (Shi in sod., 2002).

3.5 STRATEGIJE ZA IZBOLJŠANJE TOLERANCE NA SLANOST

3.5.1 Zaznavanje slanosti

Predvideva se, da so rastline sposobne zaznavati tako hiperosmolarnost kot prisotnost Na^+ ionov. Osmotski stres aktivira receptor na plazemski membrani, ki izzove sintezo abscizinske kisline (ABA), katera pozitivno regulira izražanje tonoplastnega Na^+/H^+ antiporterja AtNHX1, kar pospeši nalaganje natrijevih ionov v vakuole (Zhu, 2003). Natrijeve ione zaznavajo rastlinske celice na ekstracelularnem in na intracelularnem nivoju (Zhu, 2003). Na^+ senzor na plazmalemi poviša citosolne koncentracije Ca^{2+} , vendar danes še ni povsem jasno, ali govorimo o kalcijevem kanalu ali o proteinu, ki aktivira kalcijeve kanale (Munns in Tester, 2008). V celici pa lahko zaznavajo Na^+ mnogi proteini, ki so občutljivi na ta ion.

3.5.2 Privzem natrija v koreninska tkiva

Na^+ vdira v protoplast s pomočjo gonilne sile elektro-kemijskega gradienta preko kationskih kanalov in transporterjev (specifičnih ali nespecifičnih) ali/in vstopa v ksilem iz apoplasta (Zhu, 2003). Na^+ lahko celo blokira K^+ -specifične transporterje v koreninskih celicah in tako še dodatno zvišuje Na^+/K^+ razmerje, kar poruši normalno delovanje encimskih procesov. Pri navadnem repnjakovcu so preučevali HKT transporterje (*high K^+ -affinity transporters*), kateri pri pogojih s povišano slanostjo delujejo z nizko afiniteto tudi kot Na^+ transporterji (Uozumi in sod., 2000). S poskusi na *Eucalyptus camaldulensis* pa so dokazali, da so HKT transporterji celo bolj prepustni za Na^+ ione kot za K^+ , kadar so ekstracelularne koncentracije teh dveh ionov enake (Liu in sod., 2001). Tolerantne rastline so sposobne omejiti vstop natrija v koreninske celice ali/in povečati izražanje K^+ -transporterjev z visoko afiniteto za K^+ , s čimer vzdržujejo nizko razmerje Na^+/K^+ (Su in sod., 2002).

3.5.3 Izločanje natrija iz koreninskih tkiv

Na^+/H^+ antiporter ali SOS1 (*salt overly sensitive 1*) je membranski protein na plazemski membrani, ki ima glavno vlogo pri izločanju natrijevih ionov iz koreninskih epidermalnih celic (Zhu, 2003). Pri pogojih s povišano slanostjo je *SOS1* prepis pozitivno reguliran. Izločanje Na^+ preko SOS1 je bistvenega pomena za meristemske celice, saj le-te nimajo velikih vakuol za kompartmentizacijo škodljivih ionov (Shi in sod., 2000, 2002). SOS1 lahko najdemo v vseh tkivih, močneje je izražen predvsem v epidermalnih celicah, ki obdajajo koreninski vršiček in v parenhimatskih celicah, ki mejijo na ksilem (Shi in sod., 2002).

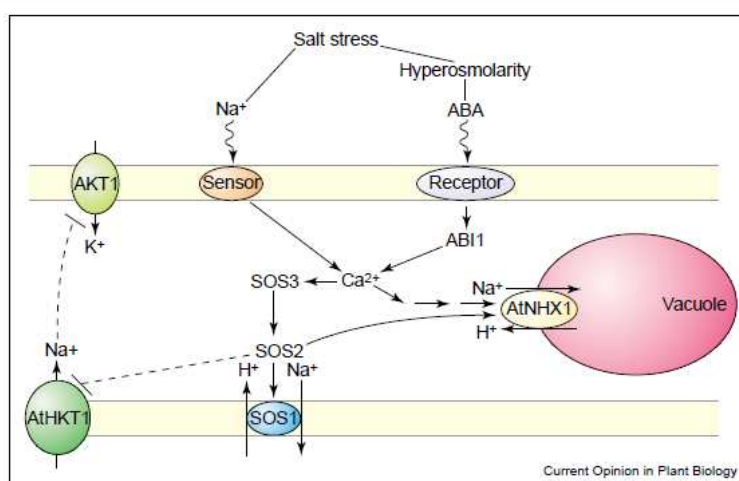
3.5.4 Celična kompartmentizacija

Črpanje Na^+ ionov v vakuole znižuje vrednosti škodljivih ionov v citosolu in hkrati popravlja osmotsko ravnovesje, kar omogoča privzem vode tudi iz slanega okolja. S poskusi na navadnem repnjakovcu so odkrili družino NHX proteinov, ki so Na^+/H^+ antiporterji, lokalizirani na tonoplastu, ki prenašajo Na^+ v vakuole. Tu sodelujejo tudi H^+ -ATP-aze, ki

ustvarjajo protonski gradient, ki je potreben za aktivnost zgoraj navedenih antiporterjev. Pri *Arabidopsis thaliana* in rižu so opazili, da slanost in abscizinska kislina (ABA) regulirata povečano izražanje *NHX1* gena (Zhu, 2003).

3.5.5 SOS signalna pot

Izločanje natrija preko SOS1 regulira SOS3-SOS2 kinazni kompleks. Slanost izzove Ca^{2+} signale, ki jih zazna SOS3, ki je senzorski protein za kalcij s tremi vezavnimi mesti za ta kation. SOS3 prenese signal tako, da aktivira SOS2, ki je serin-treonin protein kinaza. Aktiviran SOS2 nato fosforilira SOS1, Na^+/H^+ antiporter, lokaliziran na plazmalemi. SOS2 med drugim aktivira tudi *NHX1* antiporter, ki omogoča sekvestracijo Na^+ v vakuole. *AtHKT1* protein je prenašalni protein, ki omogoča vstop natriju. SOS3 negativno regulira *AtHKT1* in tako zmanjša vstop natrija v citosol (Slika 2) (Zhu, 2003).



Slika 2: SOS signalna pot (Zhu, 2003). Signalna pot, ki regulira izražanje in aktivnost ionskih transporterjev za vzdrževanje nizkega citosolnega Na^+ pri povišani slanosti. Povišan Na^+ in hiperosmolarnost zaznata sensorja, ki nista poznana. Na Ca^{2+} občutljiv kompleks SOS3-SOS2 regulira izražanje in aktivnost Na^+ transporterjev in s tem koncentracije citosolnega Na^+ . Hiperosmolarnost naj bi izzvala sintezo ABA, katera naj bi pozitivno regulirala transkripcijo *AtHKT1*. S prekinjeno črto je nakazana možna negativna regulacija *AtHKT* z SOS3-SOS2 kompleksom in AKT1 z intracelularnim Na^+ .

3.5.6 Osmoliti in osmoprotektanti

So organski topljenci, ki pomagajo pri nižanju vodnega potenciala korenin in ščitijo biomolekule pred negativnimi posledicami osmotskega stresa. Ne inhibirajo ali spreminjajo biokemijskih reakcij in so sposobni stabilizacije kvartarnih struktur proteinov.

Pogosto so dobro topne, nevtralne spojine, ki vključujejo sekundarne metabolite, kot so amino kislina prolin, kvartarni amin glicinbetain, alkoholi sladkorjev (manitol, sorbitol), sladkorji (trehaloza, saharoza) (Tester in Davenport, 2003). Geni, ki kodirajo biosintezo osmoprotektantov so pozitivno regulirani ob stresu s slanostjo.

2.5.7 Fotosinteza in stomatalna prevodnost

Tolerantne rastline so sposobne zapreti listne reže kot odgovor na slanost. Tako minimizirajo izgubo vode s transpiracijo, vendar hkrati onemogočajo vstop CO₂ v rastlinska tkiva. Pri dolgotrajnem zaprtju listnih rež lahko pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ), saj kombinacija stalne osvetlitve in nižjega parcialnega tlaka CO₂ vodita v fotoinhibicijo.

3.5.8 Reaktivne kisikove zvrsti (RKZ)

K reaktivnim kisikovim zvrstem prištevamo vodikov peroksid (H₂O₂), superoksidni anion (O₂⁻) in hidroksilne radikale (OH[•]). So zelo reaktivni in v previsokih koncentracijah povzročajo peroksidacijo lipidov, škodo na proteinih in DNK, v nizkih koncentracijah pa delujejo kot signalne molekule. Primarna mesta generacije RKZ so mitohondriji, peroksisomi, kloroplasti in apoplast. Za uravnavanje količine RKZ skrbijo celični antioksidanti, kot so askorbat (vitamin C), tokoferoli (vitamin E), karotenoidi in glutatione ter encimi, ki razstrupljajo RKZ (katalaza, superoksidna dismutaza, askorbat peroksidaza, ...). Celični antioksidanti in encimi, povezani z metabolizmom RKZ vplivajo na celično redoks stanje preko katerega lahko vplivajo na izražanje genov, povezanih z odgovorom na biotski in abiotski stres in tako skušajo izboljšati obrambo ali aklimatizacijo na neugodne pogoje (Foyer

in Noctor, 2005). Vplivajo tudi na rast in razvoj rastlin, saj modulirajo procese kot so mitoza, elongacija celic in senescenca (De Pinto in De Gara, 2004).

3.5.9 Programirana celična smrt (PCS)

Programirana celična smrt je proces, ki se je skozi evolucijo ohranil v živalskem in rastlinskem kraljestvu. Ima pomembno vlogo pri raznih fizioloških procesih mnogoceličnih organizmov kot so razvoj, vzdrževanje celične homeostaze pluricelularnih organizmov, senescenca, odstranjevanje poškodovanih celic, ... (Williams in Dickman, 2008).

Celice, ki so aktivirale programirano celično smrt lahko prepoznamo glede na nekatere morfološke značilnosti, in sicer krčenje celic, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNK, apoptotska telesa, ... PCS lahko sproži hiperprodukcija RKZ, pravzaprav naj bi reaktivni kisikovi radikali delovali kot iniciacijski signal za sprožitev programa celične smrti (Panter in Dickman, 2004).

PCS v koreninah omogoča reciklacijo nukleotidov in amino kislin iz poškodovanih celic, katere rastlina pošilja v poganjke za popravljanje škode (posledic neugodnih dejavnikov) (Williams in Dickman, 2008). Katsuhara in Shibasaka sta leta 2000 opazovala obnašanje korenin ječmena, katere sta za 24 ur izpostavila 300 mM NaCl. Koreninska tkiva, v katerih je prišlo do celične smrti, niso ponovno zaživela, poganjki pa so preživeli in so si opomogli po odstranitvi soli. To nakazuje pomembnost PCS pri toleranci na kratkotrajni stres, saj rastlina žrtvuje nenujne celice za neko višje dobro, za obnovo in popravljanje škode. Morda se zdi paradoksalno, vendar PCS pomaga preživeti rastlinam, kadar so pod vplivom biotskega ali abiotskega stresa (Chen in sod., 2009).

3.6 PROTEOMIKA IN DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA

Koncept preučevanja vseh proteinov, ki jih je sposoben izraziti nek genom, je zares zaživel leta 1994, ko je doktorand avstralske narodnosti Marc Wilkins, na znanstvenem simpoziju v Sieni v Italiji prvič uporabil izraz PROTEOM; kar predstavlja vsoto vseh PROTEinov, ki jih je sposoben izraziti nek genOM. Proteomika se ukvarja z identifikacijo, kvantiteto, določanjem strukture, študijem biokemičnih in celičnih funkcij vseh proteinov v nekem organizmu, organu ali organelu, in spremembe izražanja v prostoru, času in fiziološkem stadiju (Agrawal in Rakwal, 2005).

Pomembnost proteomskih raziskav je leta 1997 poudaril Nobelov nagradjenec Edmond H. Fischer: »Določanje nukleotidnega zaporedja genoma nam lahko omogoči predvidevati proteine, ki so lahko potencialno izraženi, vendar ne vemo kje, kdaj in na katerem nivoju« (Wilkins in sod., 1997). Genom namreč ne predstavlja posnetka nekega organizma v določenem trenutku, saj je le-ta statičen, in so pravzaprav funkcionalni proteini, ki omogočajo živim bitjem preživeti in prilagoditi se danemu okolju. Ne geni, ampak proteini so tisti, ki so neposredno odgovorni za funkcionalnost in fenotip celic.

Čeprav je proteomika še v povojih, je bil hiter razvoj te panoge v zadnjih letih posledica napredka v genomiki in razvoja novih tehnologij. Za beleženje sprememb izražanja kompleksnih proteinskih mrež je najpogosteje uporabljena tehnika dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE) (O'Farrell, 1975), saj ima vsaj štiri prednosti: prvič, lahko loči stotine proteinov (in njihove modificirane oblike) in omogoča pridelavo gelov z visoko ločljivostjo. Drugič, 2-DE omogoča nadaljnjo karakterizacijo proteinov v gelu ali po prenosu na membrane. Tretjič, omogoča nam hitro izdelavo kvalitetnih referenčnih map in četrtič, dostopnost z ekonomskega vidika.

Dvodimenzionalna elektroforeza je kombinacija dveh neodvisnih tehnik, izoelektričnega fokusiranja (IEF) in SDS-PAGE (poliakriamidna gelska elektroforeza z uporabo natrijevega dodecil sulfata). V prvem koraku z izoelektričnim fokusiranjem ločimo proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI), v drugem koraku pa jih z SDS-PAGE ločimo glede na

molekulsko maso (MW). Rezultat je gel z dvodimenzionalno mrežo lis, ki predstavljajo posamezne proteine.

Ena glavnih prednosti te tehnike je možnost zaznavanja post-translacijskih sprememb, katere se odražajo kot sprememba naboja in mase proteina. Slabost dvo-dimenzionalne elektroforeze je nehomogena zastopanost proteinov v ekstraktu, slaba ločitev najmanjših in največjih molekul, proteinov z ekstremnim pI (zelo kislim ali zelo bazičnim). Izjemno težko je kvantificirati in identificirati šibko izražene proteine. Poleg tega se lahko zgodi, da se lisi dveh proteinov s podobnimi lastnostmi prekrivata.

Priprava kvalitetnih vzorcev, torej ekstrakcija maksimalnega števila proteinov iz dane celice, tkiva, organa ali organizma, je prvi in najbolj kritični korak za nadaljnjo ločevanje in identifikacijo proteinov. Ključni dejavnik za dobro ekstrakcijo je izbira ustreznega ekstrakcijskega pufera. Dober ekstrakcijski puffer mora imeti dve pomembni lastnosti: prvič, sposobnost ekstrakcije vseh proteinov in drugič, mora preprečiti proteolitično razgradnjo našega vzorca. Za pripravo vzorcev za proteomske analize v enokaličnicah se najpogosteje uporablja ekstrakcijo z acetonom in trikloroocetno kislino v kombinaciji z litičnim pufrom (»lysis buffer«, LB). Glavna prednost te metode je takojšnja precipitacija proteinov in istočasna inaktivacija proteaz. Poleg tega ta metoda odstrani tudi nečistoče, kot na primer soli, pigmente, polifenole itd., saj ti pogosto interferirajo z IEF (Agrawal in Rakwal, 2005).

3.7 PROTEOMSKE RAZISKAVE

Prvi podatki o vplivu abiotskega stresa na proteom rastlin so bili objavljeni v poznih osemdesetih letih. Tedaj so proteini ostajali anonimni, vendar so kljub temu proteomske raziskave razkrivale dejstva, da abiotski stres izzove novo proteinsko sintezo (Hurkman in Tanaka, 1987) in da obstajajo različni proteinski vzorci v različnih membranskih frakcijah (Hurkman in sod., 1988). Z uporabo Edmanove degradacije, je bilo mogoče oblikovati prve sezname proteinov, katere inducira abiotski stres (Costa in sod., 1998; Riccardi in sod., 1998). Ta postopek je zelo počasen, saj je mogoče določiti zaporedje le 1-2 proteinom dnevno in

zahteva relativno velike količine vzorca, kar omejuje možnost določanja aminokislinskih zaporedij le na tiste proteine, ki so močno zastopani (Agrawal in Rakwal, 2005). Tako so v naslednjih letih prišle v uporabo nove tehnike, ki so omogočale hitrejšo in kvalitetnejšo produkcijo podatkov (visoka občutljivost in ločljivost). Te temeljijo na masni spektrometriji (MS) (Agrawal in Rakwal, 2005).

Za vrednotenje sprememb v izražanju proteinov v rastlinah pod različnimi pogoji so ključnega pomena natančne proteomske mape z visoko ločljivostjo (Hashiguchi in sod., 2009). Za riž, modelni organizem za enokaličnice, so bile narejene sistematične proteomske analize in proteomske mape poganjkov, korenin in semen (Koller in sod., 2002). Podatki o proteomu riža so zbrani v riževi proteomski bazi podatkov »Rice Proteome Database« (Komatsu in sod., 2004; <http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/>)

Danes lahko najdemo veliko raziskovalnih skupin, ki uporabljajo proteomski pristop za študije odgovora in tolerance rastlin na abiotični stres (pomanjkanje vode, povečana slanost, nizke in visoke temperature, svetloba, prisotnost težkih kovin in herbicidov). Raziskave potekajo predvsem na kulturnih rastlinah, pomembnih v humani prehrani, kot so riž (*Oryza sativa*), ječmen (*Hordeum vulgare*), pšenica (*Triticum durum*), paradižnik (*Solanum lycopersicum*), grah (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*), tobak (*Nicotiana tabacum*) in drugi ter na modelnem organizmu *Arabidopsis thaliana*. Na ječmenu (*Hordeum vulgare*) so bile narejene razne proteomske študije v različnih razvojnih stadijih (semena, kalice, zrele rastline) pod različnimi pogoji (vpliv slanosti, suše, temperaturnega stresa, ...) (Finnie in Svensson, 2009, Witzel in sod., 2009).

4 MATERIAL IN METODE

4.1 KULTIVACIJA RASTLIN

Za raziskavo smo uporabili semena ječmena (*Hordeum vulgare* L., var. Nure). Semena smo hranili v temnem prostoru, pri temperaturi 4°C.

Preden smo dali semena kaliti, smo jih potopili v vodo in jih pustili imbibirati 60 min.

Imbibirana semena smo položili na filtrirni papir, prepojen z bidestilirano vodo (ddH₂O) in jih pustili v temi kaliti 5 dni. Vsak dan smo dodali malce deionizirane vode, da je bil filtrirni papir vedno dobro napojen. Kalice smo premestili v hidroponično kulturo za naslednjih 5 dni v gojišče, z naslednjo sestavo:

Tabela 2: Sestava hidroponske raztopine

Reagent	Koncentracija
K ₂ HPO ₄	1 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
CaCl ₂	1 mM
K ₂ SO ₄	1.25 mM
MgCl ₂	1mM
FeSO ₄ -EDTA	3.5 mg/L
KCl	2.5 mM
H ₃ BO ₃	1.25 mM
CuSO ₄	0.025 mM
MnSO ₄	0.25 mM
ZnSO ₄	0.1 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.007 mM
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 mM

Tako pripravljeno hidroponsko raztopino smo zlili v plastično posodo z volumnom 3.5 L. Kalice smo namestili v skupine po 20 rastlin med plastična nosilca, obloženima s peno. Tako smo jih fiksirali, da so bile korenine potopljene v tekoče gojišče, ki smo ga nenehoma prezračevali.

Rastline smo obsevali s svetlobo gostote $300 \text{ nmol fotonov} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sek}^{-1}$, fotoperioda 16 h svetlobe / 8 h teme, v termo-reguliranem prostoru pri temperaturi $20 \text{ }^\circ\text{C}$, s 50% relativno vlago.

V hidrokulturi smo rastline pustili rasti 13 dni, nato smo dodali 500 mM raztopino NaCl ter jih pustili pri teh pogojih 6 ur.

4.2 EKSTRAKCIJA PROTEINOV S TRIKLOOROOCETNO KISLINO (TCA) IN ACETONOM (Conte in sod., 2007)

S tekočim dušikom smo strli 150 mg svežih korenin v terilnici. Vzorcju smo dodali 500 μL ekstrakcijskega pufra, ki je vseboval aceton, 20 % trikloroocetna kislina (TCA), 0.2 % ditiotreitrol (DTT) in inhibitorje proteaz (Protease inhibitor cocktail, Sigma) v razmerju 1 μL : 1 mL.

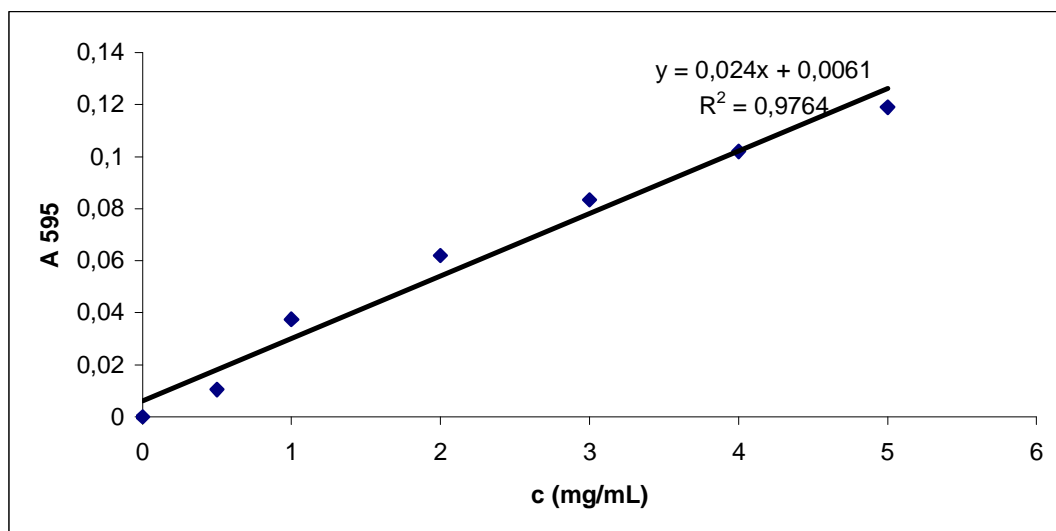
Nato smo ekstrakt centrifugirali ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 13000 obratov/min, 15 min). Zatem smo premestili supernatant v čisto centrifugirko, kamor smo dodali 1 mL mrzlega acetona in pustili precipitirati čez noč pri temperaturi $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Naslednji dan smo vzorec znova centrifugirali ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 13000 obratov/min, 1 uro) in nato odstranili supernatant ter nadaljevali postopek s peletom. Dodali smo 1.5 mL raztopine za izpiranje, ki je vsebovala mrzel aceton in 0.2 % DTT.

Vzorec smo tako pustili precipitirati 1 uro pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, sledilo je centrifugiranje ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 13000 obratov/min, 30 min). Nato smo odstranili supernatant in posušili pelet pod vakuumom.

Precipitat smo raztopili v 100 μ L litičnega pufra (LB), ki je vseboval 9 M ureo, 4 % CHAPS, 0.8 % IPG buffer pI 3 – 10 NL, 1 % DTT in še enkrat centrifugirali (4 °C, 13000 bratov, 30 min).

4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo merili z Bradfordovo metodo. Pripravili smo standarde; in sicer 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL govejega serumskega albumina (BSA) in naredili umeritveno krivuljo. Najprej smo redčili Bradfordov reagent (Protein assay dye reagent concentrate, BioRad) v razmerju 1: 7. Slednja raztopina je predstavljala slepi vzorec. Nato smo odpipetirali 6 μ L vsakega standarda v 294 μ L redčenega Bradfordovega reagenta. Absorpcijo pri valovni dolžini 595 nm smo merili s spektrofotometrom NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc.), nato pa nam je računalnik izrisal umeritveno krivuljo.



Slika 3: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu.

Nato smo izmerili absorbance vzorcev, iz katerih nam je računalnik preračunal koncentracijo proteinov. Za meritve smo redčili vzorce z Bradfordovim reagentom v razmerju 1:50.

Do nadaljnjega smo vzorce hranili v hladilniku pri temperaturi – 80 °C.

4.4 REHIDRACIJA IPG-TRAKOV

Rehidracijska tekočina je vsebovala 8 M ureo, 2 % CHAPS, 0.5 % IPG pufer pH 3-10, bromofenol modro in ddH₂O. Temu smo dodali 100 µg vzorca, 10 µg markerjev (Markers for two dimensional electrophoresis, pI razpon 7.6 - 3.8; MW razpon 17.000-89000, Sigma) in 20 mM DTT za skupni volumen 250 µL za en 13 cm-ski IPG trak. DTT smo dodali nazadnje, saj je le-ta močan reducent in zelo reaktiven.

Pripravljeno rehidracijsko raztopino, ki je vsebovala tudi vzorec in markerje, smo nanegli v režo na plošči za rehidracijo. Nato smo odmrznili IPG – trak (dolžina 13 cm, pH 3-10, NL (Amersham Biosciences)), previdno odstranili zaščitno folijo in položili trak z gelom navzdol v rehidracijsko raztopino (le-ta je morala biti enakomerno porazdeljena po vsej dolžini traku). Pazili smo, da se pod trak niso ujeli zračni mehurčki. V režo nad trak smo nalili 2 mL mineralnega olja, s čimer smo preprečili evaporacijo vode in kristalizacijo uree. Pokrili smo s pokrovom in pustili trakove rehidratirati čez noč (12 - 16h).

4.5 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Za izoelektrično fokusiranje smo uporabljali elektroforetsko enoto Multiphor II Electrophoresis system (Amersham Biosciences). Najprej smo uravnali površino elektroforetske enote, da je bila popolnoma horizontalna. Na ploščo, ki smo jo neprenehoma hladili (20 °C) smo nanegli 10 mL mineralnega olja in nanj položili steklen nosilec z elektrodami ter ga ustrezno povezali z Multiphorjem II. Na nosilec smo nalili 10 mL olja in nanj položili plastično folijo z vdolbinami za trakove. Trakove, ki smo jih čez noč rehidrirali,

smo najprej sprali z ddH₂O, nato smo jih položili v vdolbine na plastični foliji z gelom navzgor in s plusom proti anodi. Z ddH₂O smo navlažili koščka papirja, katera smo namestili pravokotno na trakove tako, da sta se dotikala obeh skrajnosti gela. Na vlažna elektrodna papirna trakova smo pritrdili elektrodi; anodo zgoraj (pri plusu) in katodo spodaj (pri minusu). Preverili smo, da je bil kontakt med elektrodo, papirnim trakom in gelom. Na tako pripravljene trakove smo nalili 60 mL olja in pokrili s plastičnim pokrovom.

Multiphor II elektroforetsko enoto smo povezali z usmernikom in programirali:

1. faza: 300 V, 1 mA, 5 W, 0:01 h,
2. faza: 3500 V, 1 mA, 5 W, 1:30 h,
3. faza: 3500 V, 1 mA, 5 W, 3:45 h - 5:10 h.

Med samim fokusiranjem smo opazili, da se je barvilo bromofenol modro pomikalo proti anodi. Po končanem IEF smo trakove shranili v nosilcu, narejenem iz aluminijaste folije in zaščiteno s plastično folijo. Do nadaljnjega smo trakove shranili v zmrzovalniku pri - 80 C.

4.6 URAVNOTEŽENJE TRAKOV

Za pripravo 10 mL ekvilibracijske raztopine smo potrebovali 1 mL 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 3.6 g uree, 3 mL glicerola, 0.1 g SDS in ddH₂O. Tako pripravljeno raztopino smo razdelili v dve epruveti. V prvo epruveto smo dodali 25 mg DTT, v drugo pa 225 mg jodoacetamida (JAA).

Nato smo nalili 2.5 mL ekvilibracijske raztopine z DTT v vsako režo plošče, katero smo uporabljali tudi za rehidracijo, in vanj potopili trak z gelom navzdol. Na oscilatorju smo inkubirali 30 min. Sledilo je kratko spiranje trakov z ddH₂O. Nato smo jih premestili v 2.5 mL ekvilibracijske raztopine z JAA in pustili inkubirati nadaljnjih 30 min na oscilatorju.

4.7 SDS - PAGE

Najprej je bilo potrebno sestaviti nosilce za gel. Med dve stekleni plošči smo položili na desno in levo stranico plastični paličici, ki sta zagotavljali primerno razdaljo med ploščama in s tem ustrezno debelino gela. To smo vpeli med nosilca in zatesnili z vijaki. Vse skupaj smo vpeli na podstavek.

Pripravili smo 12 % poliakrilamidni gel. Za pripravo 100 mL, kar je zadostovalo za dva gela, smo potrebovali 42.9 mL ddH₂O, 30 mL 40-procentnega akrilamida, 25 mL 1.5 M Tris HCl (pH 8.8), 1 mL 10 % SDS, bromofenol modro, 1 mL 10 % APS (amonijevega persulfata) in 100 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin).

Reagente smo dodajali v zgoraj navedenem vrstnem redu; TEMED smo dodali nazadnje, saj le-ta sproži reakcijo polimerizacije. Tako pripravljen gel smo vlili med stekleni plošči in nadenj nalili 3 mL ddH₂O. Ko je gel popolnoma polimeriziral, smo odlili vodo.

Ko smo vzeli IPG trakove iz ekvilibracijske tekočine, smo jih najprej malce sprali z ddH₂O. Nato smo jih s pomočjo pincete previdno prislonili ob rob steklene plošče nosilca gela in jih previdno potisnili na površino gela. Nanj smo prilili 0.5 % agarozno raztopino. Ko je tudi ta polimerizirala, smo gela z nosilci dali v elektroforetsko komoro, katero smo povezali s sistemom za hlajenje (20 °C). V komoro smo prilili 3 L pufru SDS – PAGE, ki je vseboval 25mM Tris, 0.192 mM glicin, 0.1 % SDS in ddH₂O. Nato smo povezali alimentator z elektroforetsko komoro in programirali: napetost 260 V, tok 60 mA, čas 5 h. Med elektroforezo smo gele neprestano hladili (20 °C).

4.8 BARVANJE S SREBROVIM NITRATOM

Gel smo fiksirali v 100 mL fiksacijske raztopine, ki je vsebovala 50 % etanol, 12 % očetno kislino, 0.05 % 40-procentne raztopine formaldehida pri sobni temperaturi čez noč. Nato smo izpirali gel z etanolom; in sicer 20 minut v 30 % etanolu, 20 minut v 20 % etanolu in 20 minut

v bidistilirani vodi. Zatem smo prilili senzibilizator (0.02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) za 1 minuto, sledilo je trikratno spiranje z bidistilirano vodo (20 sekund). Potem smo inkubirali gel v raztopini srebrovega nitrata, ki je vsebovala 0.2 % AgNO_3 in 0.02 % formaldehida za 20 minut. Ponovno smo gel sprali trikrat z bidistilirano vodo (20 sekund). Sledila je inkubacija v raztopini za razvijanje (3 % Na_2CO_3 , 0.05 % formaldehid) za 5 – 7 minut. Na koncu smo gel sprali z bidistilirano vodo (20 sekund) in ga potopili v raztopino, ki je ustavila reakcijo (1 % očetna kislina) za 2 uri.

4.9 SHRANJEVANJE GELOV

Gele smo shranjevali v 1 % očetni kislini do skeniranja. Nato smo jih položili na trd papir, prekrili s plastično folijo in jih posušili s pomočjo GelDryer.

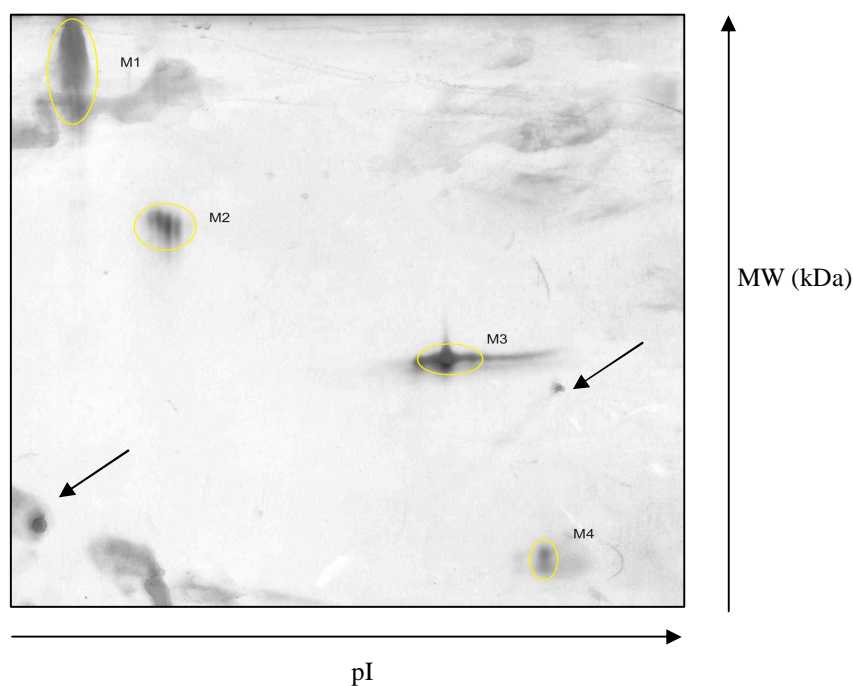
4.10 OBDELAVA PODATKOV

Izvedli smo vizualno analizo gelov. S pisalom smo obkrožili vse lise, ki smo jih videli na gelu. Vsakemu od njih smo pripisali identifikacijsko številko. S pomočjo ravnila z milimetrsko skalo smo vsaki lisi določili koordinati x in y v milimetrih. Preko znanih vrednosti markerskih proteinov smo izdelali umeritveni krivulji, s pomočjo katerih smo preračunali koordinate vseh lis na gelu v vrednosti izoelektrične točke in molekulske mase.

Izdelali smo gel, kamor smo nanесли le markerske proteine. Tako smo ugotovili, katere lise na poskusnem gelu, kamor smo nanесли vzorec in markerje, odgovarjajo markerskim proteinom. V mešanici markerjev (Sigma-Aldrich) smo imeli štiri proteine:

Tabela 3: Približne molekulske mase in izoelektrične točke markerskih proteinov.

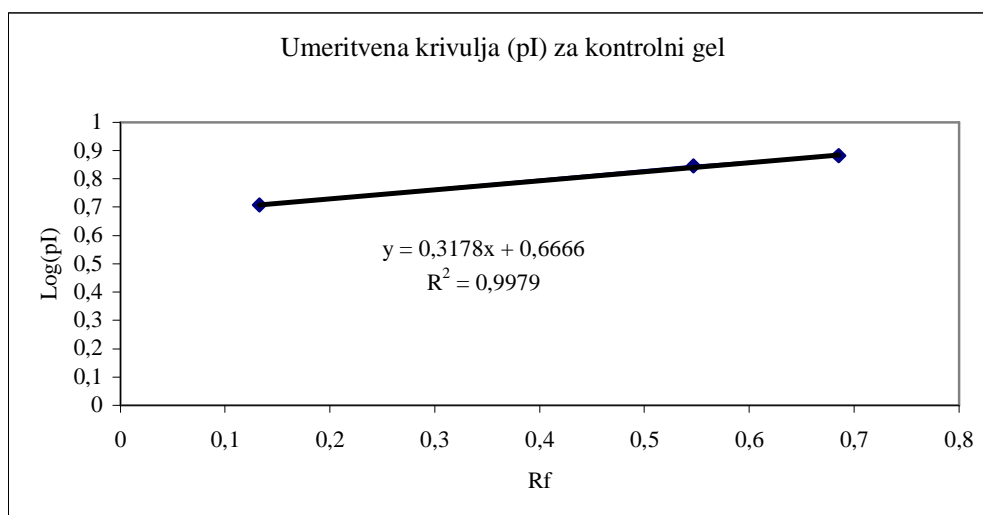
Oznaka	Protein	Približna molekulska masa (kDa)	Približna izoelektrična točka
M1	Amiloglukozidaza	89	3.8
		70	
M2	Ovalbumin	45	5.1
M3	Karbonska anhidraza	29	7.0
M4	Mioglobin	17	7.6



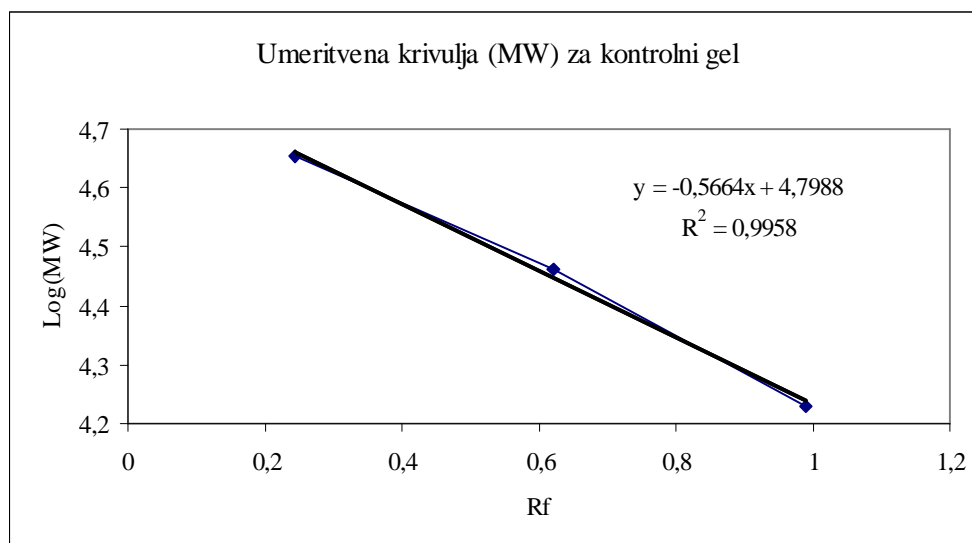
Slika 4: Gel z markerskimi proteini M1 (amiloglukozidaza), M2 (ovalbumin), M3 (karbonska anhidraza) in M4 (mioglobin). S puščicama sta označeni mesti kontaminacije.

Na gelu z markerji (slika 4) lahko opazimo dobro ločene naslednje markerje: mioglobin, karbonska anhidraza in ovalbumin. Amiloglukozidaza se je slabo ločila, pravzaprav lahko opazimo, da na mnogih gelih z vzorci le-ta celo manjka. Zaradi tega amiloglukozidaze nismo upoštevali pri izdelavi umeritvenih krivulj.

Za vsak gel smo pripravili dve umeritvini krivulji; eno za ocenitev izoelektrične točke (slika 5) in drugo za ocenitev molekulske mase (slika 6). Relativno mobilnost R_f (ali retencijski faktor) smo izračunali kot razdaljo, ki jo je prepotovala izbrana lisa, katero smo delili z razdaljo, ki je prepotovalo barvilo bromofenol modro. Na absciso grafa smo nanegli R_f , na ordinato pa logaritem molekulske mase markerjev (in izoelektrične točke v drugem primeru) in tako dobili umeritveni krivulji (Banker in Cotman, 1972).



Slika 5: Umeritvena krivulja za izoelektrično točko (pI) za kontrolni gel.



Slika 6: Umeritvena krivulja za molekularno maso (MW) za kontrolni gel.

V nadaljevanju smo vstavili koordinati x in y lis, ki so nas zanimale, v zgoraj dobljeni formuli in dobili vrednosti MW in pI lis, ki so predstavljale proteine v našem vzorcu.

S pomočjo teh dveh parametrov smo iskali možne proteine, ki so se približevale našim izračunom v bazi podatkov. Iskali smo v bazi riža »Rice Proteome Database« (National Institute of Agrobiological Sciences).

5 REZULTATI

5.1 EKSTRAKCIJA PROTEINOV

Proteine smo ekstrahirali iz zamrznjenega rastlinskega materiala. Prvič smo izvedli ekstrakcijo s TCA in acetonom po protokolu, kot je opisan v članku Conte, 2007. Koncentracije proteinov v ekstraktu so se gibale od 640 $\mu\text{g/mL}$ do 2040 $\mu\text{g/mL}$. Drugič smo ponovili postopek, povzet po istem protokolu, le da smo po dodatku ekstrakcijskega pufra dodatno vrtinčili vzorce 10 – 15 sekund. Tokrat smo imeli koncentracije proteinskih ekstraktov občutno višje, in sicer so se gibale od 1080 $\mu\text{g/mL}$ do 3320 $\mu\text{g/mL}$. Če primerjamo srednje vrednosti koncentracij prve in druge ekstrakcije lahko ugotovimo, da smo imeli v drugem primeru 64 % višjo koncentracijo proteinov v vzorcu.

5.2 OPTIMIZACIJA DELOVNEGA PROTOKOLA

Optimizacijo delovnega protokola lahko razdelimo na dva dela, in sicer na optimizacijo ekstrakcije in optimizacijo dvo-dimenzionalne elektroforeze. Protokol za ekstrakcijo proteinov s TCA in acetonom po Conte (2007) smo nekoliko spremenili in opazili, da so nam tudi minimalne modifikacije protokola prinesle vidno boljše rezultate. Pri optimizaciji dvo-dimenzionalne elektroforeze smo spreminjali maso vzorca, ki smo ga nanegli na IPG trak in čas izoelektričnega fokusiranja.

5.2.1 Optimizacija protokola za ekstrakcijo proteinov

S tekočim dušikom smo strli 200 mg (*) svežih korenin v terilnici. Vzorcju smo dodali 500 μL ekstrakcijskega pufra, ki je vseboval aceton, 20 % TCA, 0.2 % ditiotreitola (DTT) in inhibitorje proteaz v razmerju 1 μL : 1 mL. Sledilo je kratko vrtinčenje (15 sekund) (*).

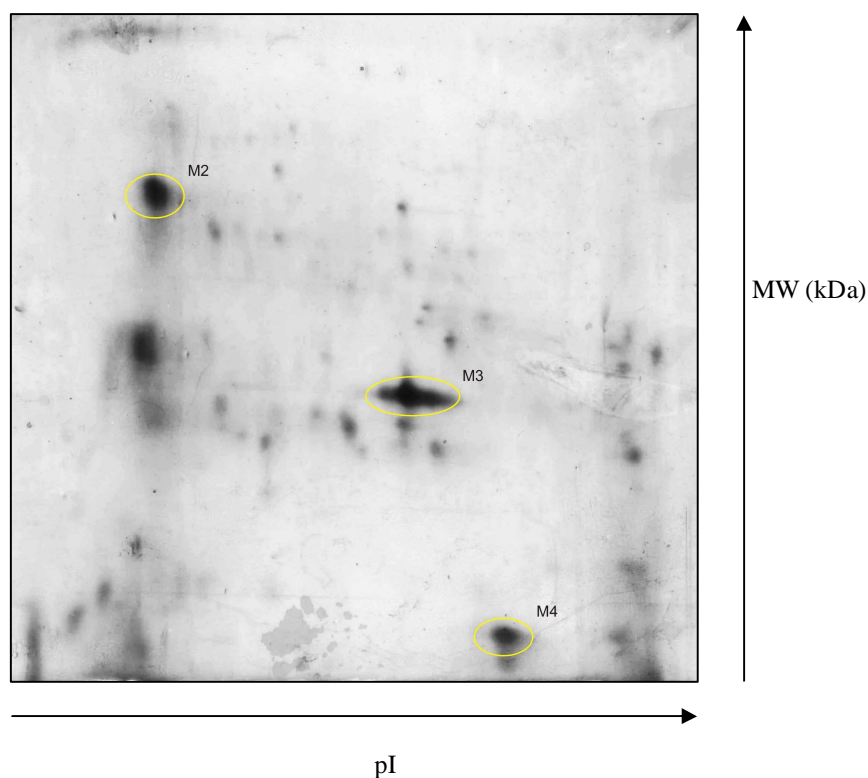
Nato smo ekstrakt centrifugirali (4 °C, 13000 obratov/min, 15 min). Zatem smo premestili supernatant v čisto centrifugirko, kamor smo dodali 1 mL mrzlega acetona in pustili precipitirati čez noč pri temperaturi – 20 °C. Naslednji dan smo vzorec znova centrifugirali (4 °C, 13000 obratov/min, 1 uro) in nato odstranili supernatant ter nadaljevali postopek s peletom. Dodali smo 1.5 mL raztopine za spiranje, ki je vsebovala mrzel aceton in 0.2 % DTT.

Vzorec smo tako pustili precipitirati 1 uro pri – 20 °C, sledilo je centrifugiranje (4 °C, 13000 obratov/min, 30 min). Nato smo odstranili supernatant in pustili pelet nekaj minut, da se je posušil na zraku (*). Precipitat smo raztopili v 100 µL LB, ki je vseboval 9 M ureo, 4 % CHAPS, 0.8 % IPG buffer pI 3 – 10 NL, 1 % DTT in še enkrat centrifugirali (4 °C, 13000 obratov/min, 30 min).

(*) – oznaka, ki nakazuje spremenjene vrednosti v optimiziranem protokolu

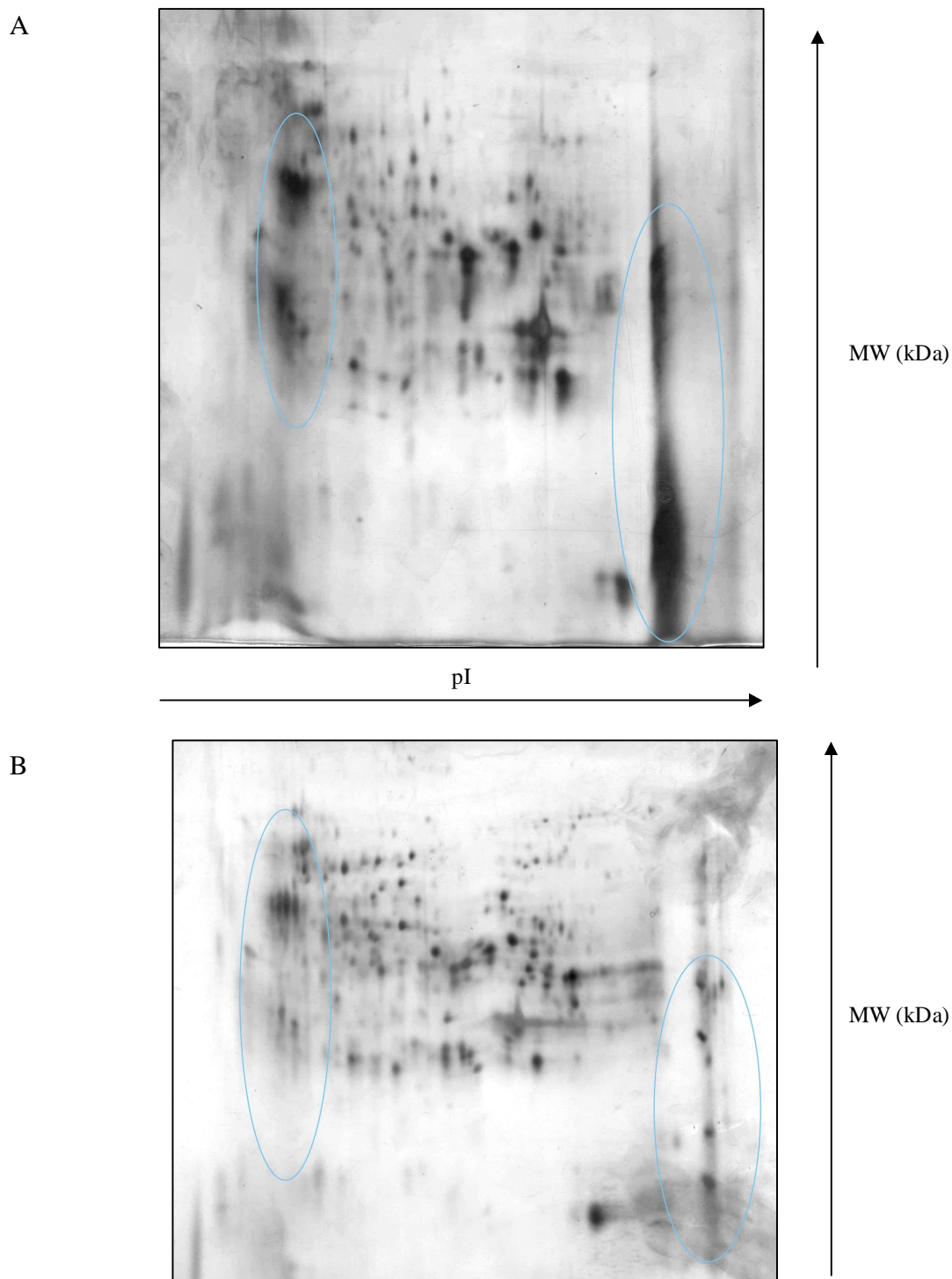
5.2.2 Optimizacija dvo-dimenzionalne elektroforeze

V priročniku z navodili za izvedbo 2D-PAGE (Handbooks from GE Healthcare) svetujejo, da se nanaša do 60 µg proteinov na en IPG trak dolžine 13 cm, kadar se uporablja barvanje s srebrovim nitratom kot tehniko za detekcijo proteinov. Ko smo razvijali gel, kamor smo nanесли 50 µg proteinov, smo močno prekoračili čas inkubacije gela v raztopini za razvijanje, saj po 5-ih minutah razvijanja, kot narekuje protokol, nismo opazili vidnih lis (razen markerskih proteinov, ki so se pojavili že po 2-eh minutah). Zato smo inkubirali kar 25 minut, da smo dobili rezultat, ki ga prikazuje slika 7. Naslednjič smo nanесли 100 µg proteinov na IPG trak. Po obarvanju s srebrovim nitratom smo imeli dober rezultat; lepo vidne lise, čas inkubacije raztopine za razvijanje se je ujema s časom, definiranim v protokolu (glej sliko 8B).



Slika 7: Gel; nanesli smo 50 μg proteinov.

Na sliki 8A lahko opazimo, da se proteini s pI pri zelo nizkem in zelo visokem pH-ju niso ločili, kar lahko vidimo kot veliko podolgovato liso, ki je označena z modro barvo. Defekt je bolj očiten na skrajnem desnem robu gela, kjer se nahajajo proteini s skrajno bazičnim pI-jem. Vzrok temu je prekratek čas izoelektričnega fokusiranja, katerega smo podaljšali iz prvotno 5 ur in 15 minut (minimalni priporočeni čas) na 6 ur in 40 minut (maksimalni priporočeni čas fokusiranja). Rezultat daljšega izoelektričnega fokusiranja je bil gel (slika 8B), kjer so vse lise dobro definirane in jasno ločene.

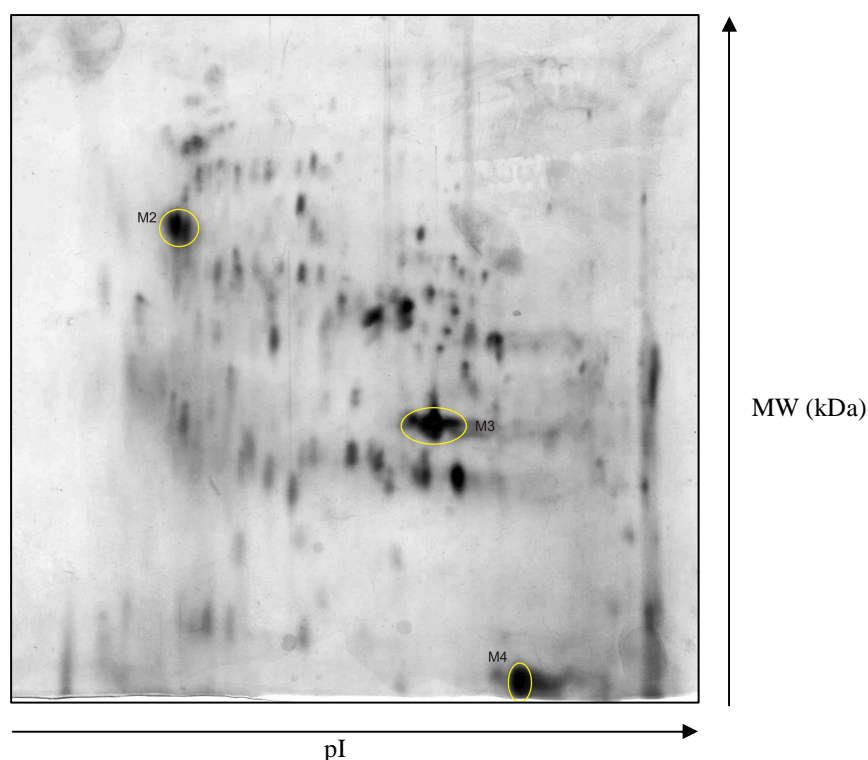


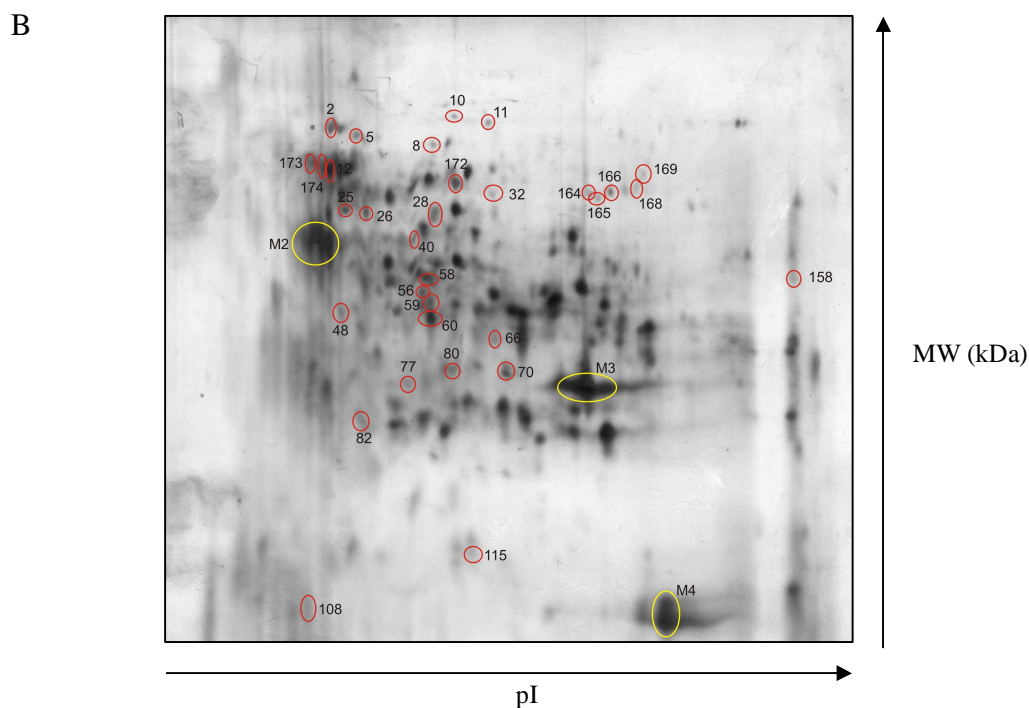
Slika 8A in 8B: Gel, kjer so se slabo ločili proteini z izoelektrično točko pri zelo kislem pH-ju in pri zelo bazičnem pH-ju (8A) in primer dobro ločenega gela (8B).

5.3 PROTEOMSKESKE ANALIZE

Na kontrolnem gelu (slika 9A) smo imeli 102 lis, na gelu z vzorcem, izpostavljenim 500 mM NaCl 6 (slika 9B) ur pa 174 lis. Natančna primerjava obeh gelov je pokazala razlike v proteinskih slikah. Negativno reguliranih je bilo 11 lis, vendar smo se osredotočili le na pozitivno regulirane lise. Zato smo podrobneje preučili 72 lis, ki so se verjetno izrazile kot odgovor rastline na slanost. Od teh 72-ih lis je bilo s pomočjo baze podatkov mogoče identificirati 32 lis, katere predstavljajo 39 proteinov. Nekatere lise so imele več dobrih potencialnih kandidatov za proteine, zato smo na seznam uvrstili vse možne, saj nismo mogli ovreči ne ene ne druge možnosti. Pod isto liso bi se pravzaprav lahko skrivala tudi dva različna proteina s podobnima molekulskima masama in izoelektrično točko. Da bi ugotovili, če je pod eno liso v resnici več lis, ki se prekrivajo, bi bilo potrebno nanesti vzorec na daljši IPG trak, kjer bi se proteina lahko ločila.

A





Slika 9A in 9B: Kontrolni gel (9A), gel; vzorec, izpostavljen 500 mM NaCl za 6 ur (9B). Z rdečo barvo so obkrožene lise, ki se na kontrolnem gelu ne pojavljajo.

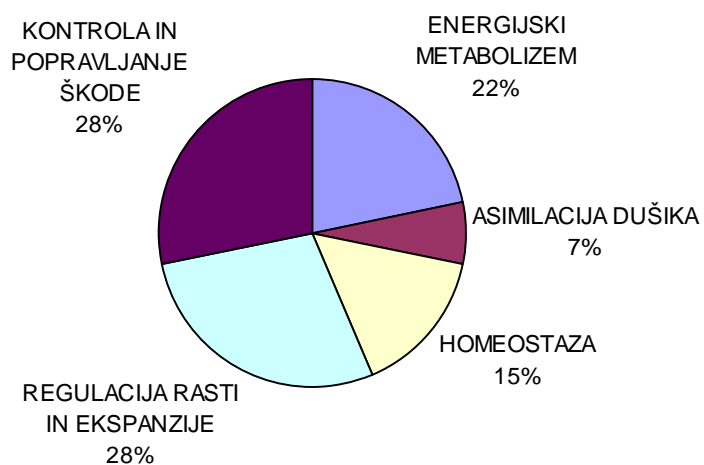
Pripravili smo tabelo z možnimi proteini, ki smo jih določili s pomočjo baze podatkov (Rice Proteome Database). Preračunane vrednosti pI in MW lis so odstopale od proteinov, ki smo jih našli v bazi podatkov, za največ $\pm 0,16$ enote pri pI in $\pm 2,4$ kDa pri molekularni masi.

Tabela 4: Pregled proteinov, za katere na podlagi naših podatkov predvidevamo, da so se izrazili v ječmenovih koreninah pod vplivom povišane slanosti.

Oznaka lise	pI lise	MW (kDa) lise	Nabor proteinov s sorodnimi lastnostmi	pI proteina	MW (kDa) proteina
2	4.997	74.18	Peroksidaza	4.95	75.17
5	5.618	71.82	Celuloza sintaza	5.65	71.46
	5.618	71.82	Galaktinol sintaza	5.56	70.97
8	6.331	58.64	Protein, ki ga inducira gravitacija	6.30	57.77
10	6.499	65.94	Glikolat oksidaza	6.57	66.16
	6.499	65.94	Regulatorni delec 26S proteosoma	6.43	65.98
11	6.680	65.94	Saharoza sintaza	6.67	65.10
	6.680	65.94	Šaperon (Hsp82)	6.64	66.61
12	5.305	53.15	Beta-ekspanzin 5	5.30	54.29
25	5.500	46.46	6-fosfoglukanat dehidrogenaza (citosolna)	5.58	44.83
	5.500	46.46	Glutation S-transferaza	5.54	47.29
26	5.728	45.75	Katalaza	5.70	45.36
	5.728	45.75	S-adenozil metionin sintetaza	5.70	46.58
28	6.331	45.06	Glutamat dehidrogenaza	6.43	42.40
32	6.708	48.74	Alfa-amilaza	6.78	49.22
40	6.220	42.50	Glicer aldehid 3-fosfat dehidrogenaza (citosolna)	6.12	39.24
48	5.438	34.87	Specifični cis-regulator osmotskega stresa	5.47	34.69
56	6.220	36.66	Malat dehidrogenaza	6.19	36.81
	6.220	36.66	Glutaredoksin	6.14	37.57
58	6.258	38.11	Alfa-ekspanzin 7	6.31	38.68
	6.258	38.11	Alen oksid sintaza	6.32	37.26
59	6.295	36.20	Alen oksid sintaza	6.32	37.26
	6.295	36.20	Malat dehidrogenaza	6.31	37.10
	6.295	36.20	Glutaminaza-asparginaza	6.37	36.80

60	6.295	34.44	Glutaminaza-asparginaza	6.37	36.80
66	6.708	32.42	Gliceralehid 3-fosfat dehidrogenaza	6.77	32.60
70	6.789	29.87	Pib protein	6.66	29.88
77	6.142	29.53	Glutation S-transferaza	6.30	27.75
80	6.467	30.22	Cu-Zn superoksidna dismutaza	6.44	31.29
82	5.674	26.96	Mn superoksidna dismutaza (mitohondrialna)	5.62	27.36
	5.674	26.96	L-askorbat peroksidaza (citosolna)	5.73	29.13
108	4.910	17.68	Cu-Zn superoksidna dismutaza (citosolna)	4.99	17.68
115	6.592	19.99	Saharoza sintaza	6.57	19.25
158	7.850	37.62	Aldolaza (citosolna)	7.90	36.30
164	7.162	48.74	Beta-ekspanzin 5	7.16	49.28
165	7.203	47.96	Beta-ekspanzin 5	7.16	49.28
166	7.262	48.74	Beta-ekspanzin 5	7.16	49.28
168	7.338	49.56	Katalaza	7.38	51.23
169	7.374	52.20	Fenilalanin-amonijak liaza	7.43	52.60
172	6.467	50.40	Alternativna oksidaza	6.47	51.35
173	4.910	55.19	Alfa-ekspanzin 21	4.81	55.35
	4.910	55.19	Peroksidaza	4.92	54.46
	4.910	55.19	Šaperon (Hsp60)	4.94	54.46
174	5.120	54.15	Kalijev kanal, beta podenota	5.05	54.18

Če predpostavimo, da so na gelu zastopani vsi potencialno možni proteini iz nabora proteinov, ki imajo podobne lastnosti kot naši rezultati, lahko izdelamo naslednji diagram.



Slika 10: Diagram, ki prikazuje relativni delež funkcionalnih skupin, katerim bi po svojih lastnostih lahko pripadali najdeni proteini.

6 DISKUSIJA

6.1 OPTIMIZACIJA DELOVNEGA PROTOKOLA

Za proteomske analize ječmenovih korenin smo izbrali dvodimenzionalno elektroforezo zaradi svoje glavne prednosti, in sicer možnosti vizualizacije vseh proteinov, ki so se izrazili pod poskusnimi pogoji v nekem določenem tkivu, v našem primeru v koreninah.

Tehnika je sestavljena iz več korakov. Pri vsakem posebej je potrebna izjemna previdnost in natančnost, saj tudi najmanjša nekorektnost pri postopku vodi v slabšanje kvalitete končnega rezultata.

Najbolj kritičen korak je gotovo priprava vzorca. Obstaja veliko protokolov za ekstrakcijo proteinov iz rastlinskega materiala, vendar je kljub mnogim informacijam težko dobiti idealni protokol. Vsaki rastlinski vrsti je potrebno prilagoditi pogoje ekstrakcije, saj se rastline med seboj razlikujejo glede na prisotnost in debelino rigidnih celičnih sten, prisotnost sekundarnih spojin, kot so polifenoli in polisaharidi (Timperio in sod., 2008).

Postopek ekstrakcije mora omogočati dobro raztapljanje proteinov v ekstracijskih pufrih, preprečevati nenadzorovane modifikacije proteinov (na primer proteolizo) in omogočati eliminacijo raznih nečistoč (Monribot in Boucherie, 2000). Za naš poskus smo izbrali ekstracijski pufer s TCA in acetonom, ki omogoča direktno precipitacijo proteinov ter hkrati omogoča eliminacijo nekaterih nečistoč, kot so soli, pigmenti, polifenoli, ... Negativna plat uporabe tega ekstracijskega pufra naj bi bilo težavno raztapljanje proteinov v LB (Agrawal in Rakwal, 2005). Pa vendar smo opazili, da sušenje peleta (odstranjevanje raztopine za spiranje) pod vakuumom pretirano dehidratira proteine, kar se je kazalo v izjemno težavnem raztapljanju peleta v LB, to pa je vodilo v izgubo proteinov. Tako smo namesto sušenja pod vakuumom sušili vzorce kar v laboratoriju; pustili smo odprte centrifugirke nekaj minut, vendar smo bili pozorni, da se pelet ni popolnoma izsušil. Na nekaterih gelih (slika 8B in 9B)

lahko opazimo prazen vertikalni pas na desni polovici gela. Vzrok temu naj bi bile nečistoče v vzorcu. Predvidevamo, da so posledica ostanka tekočine za spiranje, katere nismo uspeli popolnoma odstraniti pred dodatkom LB.

V literaturi smo zasledili, da kombinacija kemijskih in fizikalnih metod omogoča pripravo kvalitetnejših proteinskih vzorcev (Islam in sod., 2004). Zato smo izvedli postopek ekstrakcije proteinov na dva načina; in sicer, prvič smo izvedli ekstrakcijo po protokolu (Conte, 2007), drugič pa smo protokolu po Conte dodali dodaten korak vrtnčenja (za 10-15 sekund). Nato smo primerjali srednje vrednosti koncentracij proteinov v vzorcih prve in druge ekstrakcije ter ugotovili, da smo imeli v drugem primeru 64 % več proteinov v dobljenem ekstraktu.

Pri rokovanju z IPG trakovi je potrebna izredna previdnost, spretnost in natančnost. Po odstranitvi zaščitne folije s traku, gel z imobiliziranim pH gradientom ne sme priti v stik z nobeno površino, saj lahko v nasprotnem primeru pride do kontaminacije s proteini (npr. keratini), ki so lahko prisotni na steklovini, rokavicah, nosilcih, če smo se jih predhodno dotikali z golimi rokami ali če niso bili ustrezno očiščeni. Primer kontaminiranega gela lahko vidimo na sliki 4, kjer sta mesti kontaminacije označeni s puščicama.

Potrebna je natančnost tudi pri pripravi instrumenta za izoelektrično fokusiranje. Morda bi opozorila na pripravo papirnih trakov, ki jih položimo pravokotno na konce IPG trakov in na katere pritrdimo elektrodi. Papirna trakova morata biti vlažna, da prevajata električni tok in omogočata potek fokusiranja. Papirna trakova naj ne bi bila prekomerno mokra, saj to lahko povzroča 'kapljanje' lis in tako slabša kvaliteto 2D gela. Potrebno je paziti, da vodo, s katero navlažimo trakova, enakomerno porazdelimo po celotni dolžini. Če kak delček ostane suh ali nehomogeno navlažen, se papirni trak lahko 'vžge' in tako ne prevaja več toka, kar pomeni, da izoelektrično fokusiranje na delu, kjer je prišlo do te težave, ne poteka.

Za potrditev naših domnev bi v nadaljevanju izbrali nekatere lise in jih identificirali s pomočjo tehnike MALDI-TOF-MS (*m*atrix *a*ssisted *l*aser *d*esorption/*i*onization - *t*ime *o*f *f*light - *m*ass

spectrometry). Verjetno bi se osredotočili na proteine, ki sodelujejo pri vzdrževanju celične homeostaze in kontroli ter popravljanju škode.

6.2 ODGOVOR JEČMENOVIH KORENIN NA POVEČANO SLANOST

Vsa tla vsebujejo vodotopne soli, katere so ključnega pomena za normalno rast in razvoj rastlin, saj so vir večine esencialnih makro- in mikro-nutrientov. Na nekaterih območjih, med katerimi izstopajo namakane obdelovalne površine, pogosto srečamo prekomerno slane prsti. Te nastanejo kot posledica progresivne akumulacije vodotopnih soli, ki izvirajo predvsem iz namakalne vode slabe kvalitete. Posledice previsokih vrednosti soli v prsti lahko postanejo toksične za rastline, kar se vidi predvsem kot padec produktivnosti polj. Prvi simptomi so uvelost rastlin in zmanjšana rast poganjkov in so posledica osmotske komponente slanosti. Ionska komponenta se kaže kot senescenca in nekroza starejših listov (Tester in Davenport, 2003). Neto redukcija produktivnosti je torej posledica zmanjšane rasti in krajšanje življenjske dobe posameznih listov (Munns, 2002).

Podrobno smo analizirali gel, na katerega smo nanegli vzorec, izpostavljenega 500 mM NaCl 6 ur. S pomočjo baze podatkov (Rice Proteome Database) smo našim rezultatom poiskali proteine s sorodnimi lastnostmi.

6.2.1 Kategorije proteinov

Določene proteine smo razdelili v dve skupini. Prva skupina posredno in druga skupina neposredno sodelujeta pri aklimatizaciji oziroma odgovoru rastline na slanost (Zhu, 2002). V razred proteinov, ki sodelujejo pri aklimatizacijskih odgovorih in posredno izboljšujejo toleranco rastline na slanost, smo uvrstili encime, ki zagotavljajo povišano proizvodnjo energije v obliki ATP, NADPH⁺, NADH⁺ in FADH₂ (glikolitični in respiratorni encimi), in encime, ki povišujejo asimilacijo dušika. Ko se rastlina znajde v stresnih, torej neugodnih pogojih, mora za preživetje spremeniti tip metabolizma in preusmeriti biosintezo v produkcijo biomolekul, ki omogočajo obrambo in toleranco na nove pogoje v okolju. Razred proteinov, ki

neposredno sodelujejo pri toleranci rastline na povišano slanost, smo razdelili na tri podskupine: a) vzdrževanje homeostaze, b) kontrola in popravljanje škode in c) kontrola rasti in ekspanzije (povzeto po Zhu, 2002).

6.2.2 Proteini, povezani z energijskim metabolizmom

Opazili smo novo nastalih 10 lis, ki predstavljajo proteine, povezane z energijskim metabolizmom. Največ jih pripada skupini glikolitičnih encimov. Med njimi je bila saharozna sintaza, aldolaza, gliceraldehid-3-dehidrogenaza, alfa-amilaza, 6-fosfoglukanat dehidrogenaza, malat dehidrogenaza, alternativna oksidaza in glikolat oksidaza. Vincent in Zivy (2007) govorita o tipični indukciji glikolitičnih encimov v rastlinah, izpostavljenim abiotskemu stresu. Ta sama po sebi ne more razlagati aklimatizacijskih mehanizmov, vendar je pomembna za nenehen dotok energije, ki jo rastlina potrebuje za odgovor na neugodne razmere. Kim in sod. (2007) poročajo, da sta malat dehidrogenaza in gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza kritični za generiranje energije v koreninah. Fernandes in sod. so leta 2004 s poskusi na *Lupinus albus*, izpostavljenem povišani slanosti, zabeležili dvig vrednosti saharoze v listih, kar pripisujejo povišani aktivnosti saharozne sintaze. Vrednosti glukoze so bile občutno nižje. To naj bi bil odraz povišane zahteve po glukozi za celično dihanje, ki tako neprestano zagotavlja dotok ATP in NAD(P)H (Guerrier 1988, Krishnaraj in Thorpe 1996, povzeto po Fernandes in sod., 2004). Metabolna fleksibilnost pri rastlinah pomeni dopolnjevanje istega koraka v metabolni poti na različne načine (Plaxton in sod., 2002, cit. po Dobrota, 2006) in je pomembna za sposobnost aklimatizacije na stresne razmere. Metabolni odgovori na ekstremne razmere naj bi služili omejevanju negativnih posledic stresa (Dobrota, 2006). Na splošno velja, da stres vodi v povišanje ravni respiracije in v sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti (Rizhsky in sod., 2002). Kaur in sod. (2003) so opazili povečane aktivnosti amilaze in saharozne sintaze v kotiledonih kalic čičerike (*Cicer arietinum*) pod vplivom povečane slanosti. Na podlagi svojih rezultatov sklepajo, da amilaza in saharozna sintaza (ter drugi encimi, ki sodelujejo pri sintezi saharoze) delujejo sinergistično in tako povečajo svoj efekt.

Vendar se večina raziskovalnih skupin, ki preučujejo odnos med alfa-amilazo in povišano slanostjo strinja z dejstvom, da slanost negativno regulira alfa-amilazo (Ozturk in sod., 2002).

Med novo nastalimi proteini je tudi citosolna 6-fosfoglukanat dehidrogenaza, ki je encim oksidativne poti pentoznih fosfatov (OPPP). Primarne funkcije OPPP so produkcija NADPH^+ , preskrbuje celice z riboza-5-fosfatom, ki je potrebna za biosintezo nukleotidov oziroma nukleinskih kislin, lahko pa tudi sodeluje pri reciklaciji pentoznih sladkorjev (kateri izvirajo iz razgrajenih nukleinskih kislin), ki so potrebni za sintezo nukleinskih kislin, aromatskih aminokislin in maščobnih kislin v ne-fotosintetskih tkivih (Huang in sod., 2003). Huang in sod. (2003) so s poskusi na rižu pokazali, da se 6-fosfoglukanat dehidrogenaze odziva na povišano slanost, saj že 0,5 urna izpostavitve slanosti izzove biosintezo.

Iz tega lahko sklepamo, da je povečano izražanje teh encimov verjetno posledica povišane potrebe po energiji, katero rastlina potrebuje za biosintezo proteinov, ki omogočajo preživetje v ekstremnih pogojih. Organizem pridobiva energijo iz mnogih vrst ogljikovih hidratov, in sicer iz škroba, saharoze in pentoznih sladkorjev.

Močnejše sta bili izraženi tudi dve izoformi malat dehidrogenaze, encima, ki sodeluje pri več metabolnih poteh. Ta encim odcepi vodikov atom malatu in tako katalizira reakcijo, katere produkta sta oksalacetat in NADH . Sodeluje pri Calvinovem ciklu, pri Krebsovem ciklu, pri glioksilatnem ciklu in pri procesu glukoneogeneze. Ker smo se omejili na proteomske analize korenin, lahko izključimo sodelovanje tega encima pri Calvinovem ciklu, saj se le ta vrši le v fotosintetskih tkivih, kjer poteka fiksacija CO_2 v organsko snov. Višja koncentracija malat dehidrogenaze lahko pomeni hitrejše delovanje Krebsovega cikla in omogoča hitrejšo proizvodnjo NADH^+ , FADH_2 in ATP . Pri procesu glukoneogeneze lahko pospeši pretvorbo založnih molekul v obliki lipidov v saharozo, ki je primarni substrat za glikolizo v rastlinah. Sodeluje tudi pri glioksilatnem ciklu, čigar funkcija je pretvorba dveh molekul acetil koencima A, ki izvira iz beta oksidacije, v sukcinat, ki je nadaljnje metaboliziran v mitohondriju in nato v citosolu ter vodi v biosintezo saharoze. Naše opazovanje podpirajo članki mnogih raziskovalnih skupin, ki so opazili povišano izražanje tega encima kot odgovor na povišano

slanost, med njimi tudi Kumar in sod. (2000). Ta rezultat nam potrjuje dejstvo, da rastlina razgrajuje razne založne molekule in jih pretvarja v primarni substrat glikolize, da zadosti povišane energijske potrebe rastline.

Alternativna oksidaza je membranski protein, lociran v notranji mitohondrijski membrani in sodeluje pri prenosu elektronov po dihalni verigi. Ima pomembno vlogo, kadar pride do nasičenja dihalne verige, saj sprejema elektrone direktno od ubikvina. Tako preprečuje nastanek toksičnih kisikovih radikalov. Opisujejo jo kot alternativo pot pri odgovoru na abiotični stres. Kong in sod. (2000) so zabeležili pozitivno regulacijo alternativne oksidaze kot odgovor na prisotnost povišanih vrednosti soli v okolju. Ta naj bi preprečevala ali zmanjševala sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki lahko povzročajo škodo na biomolekulah. Vendar nekateri raziskovalci menijo, da so primarni induktorji izražanja alternativne oksidaze reaktivne kisikove zvrsti (McIntosh in sod., 1998), do sinteze katerih pride pod vplivom slanosti.

Glikolat oksidaza je peroksisomalni protein, ki oksidira glikolat v glioksilat in vodikov peroksid in tako sodeluje pri procesu fotorespiracije. Goyal in sod. so že leta 1987 pokazali, da je povišana aktivnost glikolat oksidaze posledica nižje neto vrednosti fotosinteze. Glede na to, da vemo, da slanost posledično vodi v nižanje nivoja fotosinteze, lahko sklepamo, da aktivnost glikolat oksidaze pozitivno regulira povišana slanost v okolju.

6.2.3 Proteini, povezani z asimilacijo dušika

Zasledili smo tudi sintezo *de novo* dveh proteinov, povezanih z asimilacijo dušika: glutamat dehidrogenaze in glutaminaze-asparaginaze. Glutamat dehidrogenaza (GDH) je encim, ki omogoča asimilacijo in reasimilacijo dušika. Študije na transformiranih rastlinah tobaka in nekaterih žitaric, ki prekomerno izražajo bakterijsko glutamat dehidrogenazo, so pokazale, da so te rastline sposobne tolerirati pomanjkanje vode v višji meri kot netransformirane kontrolne rastline (Dubois in sod., 2003). Tudi Purcino s sod. (1998) je dokazal, da je glutamat

dehidrogenaza povezana z odgovorom na stres. Loulakis and Roubelakis-Angelakis (2001) razlagata, da je GDH sposobna zaznavati redoks status v celicah in sta ga imenovala protein, ki zaznava stres (»stress monitoring protein«). Omenjene študije podpirajo naš rezultat, ki nam dokazuje, da slanost pozitivno regulira izražanje glutamat dehidrogenaze.

Novonastala glutaminaza-asparginaza je encim, ki katalizira reakcijo pretvorbe glutamina v glutamat in amonijak ter aspargina v aspartat in amonijak. Lahko bi sodelovala pri reciklaži nerabnih in poškodovanih proteinov in reasimilaciji dušika.

Biosinteza zahteva veliko energije, zato lahko na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je rastlina povišala izražanje nekaterih encimov, s katerimi je povečala hitrost proizvodnje z energijo bogatih molekul in asimilacijo dušika, torej je povišala vnos osnovnih gradbenih enot in energije za sintezo nekaterih biomolekul (proteinov, nukleinskih kislin).

6.2.4 Proteini, povezani z vzdrževanjem celične homeostaze

Zaznali smo 7 lis, ki naj bi predstavljale proteine, ki pomagajo vzdrževati celično homeostazo in se aktivirajo takoj, ko rastlino vzpostavimo neugodnim pogojem. Mednje spadajo proteini signalnih poti, ki jih sprožita osmotski in ionski stres in skušajo ponovno vzpostaviti celično ravnovesje pa čeprav pod vplivom neugodnih faktorjev (Zhu, 2002). Pozitivno regulirani proteini te skupine pod poskusnimi pogoji so bili kalijev kanal, lipoksinogenaza, alen oksid sintaza, specifični cis regulator osmotskega stresa, PIB protein in proteinski produkt gena, ki sodeluje pri odgovoru na gravitacijo (»*strong gravity responsive gene*«). Zaznali smo močnejšo izražanje kalijevega kanala (beta podenota). V prisotnosti povišanih koncentracij NaCl v okolju se poruši razmerje med K^+ in Na^+ ioni v celici, kar slabša delovanje mnogih encimskih procesov. Lahko predvidevamo, da za povečanje oziroma optimizacijo privzema K^+ , rastlina sintetizira dodatne kalijeve kanale. Naše domneve podpirajo ugotovitve raziskovalne skupine Fang in sod. (1998), ki so dokazali, da spremembe koncentracije celičnega K^+ (kar je ena izmed fizioloških posledic povišane slanosti) alterirajo izražanje genov, ki kodirajo podenote kalijevih kanalov.

Dve novo nastali lisi smo pripisali lipoksigenazi in alen oksid sintazi, ki sta odgovorni za proizvodnjo oksilipinov, ki so oksiginirane maščobne kisline. Mednje uvrščamo tudi jasmonate (jasmonska kislina in metil jasmonat), ki sodelujejo pri odgovoru na fizični stres in herbivorijo. Sasaki-Sekimoto in sod. (2005) so dokazali, da jasmonska kislina inducira izražanje genov obrambnih spojin (kot že znano) in regulira tudi biosintezo glutatione in askorbata, pomembnih rastlinskih antioksidantov. Torej lahko sklepamo, da je rastlina aktivirala metabolno pot jasmonske kisline za proizvodnjo antioksidantov, ki naj bi tako v višjih koncentracijah uspešneje razstrupljajli RKZ in preprečevali usodne poškodbe pomembnih celičnih elementov. Na splošno je znano, da ima abscizinska kislina (ABA) pomembno vlogo pri fiziologiji stresa, vendar obstajajo tudi od ABA neodvisne metabolne poti, ki kontrolirajo stresne razmere. Leta 1994 sta Yamaguchi-Shinozaki in Shinozaki objavila članek, kjer omenjata od ABA odvisne in od ABA neodvisne transdukcijske kaskade, ki povezujejo začetni signal, ki ga sproži stres (na primer suša), in izražanje specifičnih genov. Dokazala sta obstoj cis-elementov, ki v prisotnosti visokih vrednosti NaCl pozitivno regulirajo izražanje nekaterih genov po metabolni poti, ki je neodvisna od ABA. V omenjenem članku poudarjata pomembnost od ABA neodvisnih metabolnih poti, saj naj bi slednje v nasprotju z od ABA odvisnimi potmi, poskrbele za takojšnjo izražanje obrambnih genov in remediacijo neugodnih razmer. Opazili smo novo sintezo specifičnega cis-regulatorja osmotskega stresa (WSI18). Ta protein naj bi bil po svojih lastnostih podoben nekaterim LEA proteinom, katerih biosintezo izzove pomanjkanje vode (Joshee in sod., 1998). Kar zadeva novonastali protein, ki se odziva na gravitacijo, lahko poročamo, da sta Kwon in Oonu leta 1992 objavila članek, v katerem sta s pomočjo dvodimenzionalne elektroforeze preučevala proteine, ki naj bi sodelovali pri odgovoru na gravitacijski stres, a tega na molekularnem in genetskem nivoju nista uspela potrditi. Druge literature v zvezi s to skupino proteinov nismo zasledili. Lahko predvidevamo le, da omenjeni protein sodeluje pri odgovoru na stresne razmere. Novo izražen je bil tudi proteinski produkt *Pib* gena. To naj bi bil eden izmed genov, ki se odzovejo na okoljski stres. Pripisujejo mu pomembno vlogo predvsem pri vzpostavitvi rezistence rastlin na patogene glive, vendar ga povezujejo tudi z odgovorom na abiotski stres (kot so nizke

temperature, dehidracija, celjenje ran, ...), čeprav je njegova vloga v teh procesih še nejasna (Wang in sod., 1999).

6.2.5 Proteini, ki sodelujejo pri kontroli in popravljanju škode

V podskupino proteinov, ki sodelujejo pri kontroli in popravljanju škode, smo uvrstili proteine, ki sodelujejo pri razstrupljanju RKZ, stabilizaciji proteinov (šaperoni) in odstranjujejo poškodovane/denaturirane celične elemente. Identificirali smo 12 lis, ki naj bi predstavljale proteine te skupine; od tega večina encimov pripada metabolnim potem, ki razstrupljajo RKZ. Opazili smo sintezo *de novo* treh encimov, ki sodelujejo pri glutathion-askorbatnem ciklu, čigar glavna vloga je odstranjevanje velikih količin vodikovega peroksida (Chew in sod., 2003). Ti encimi so glutathion S-transferaza, glutaredoksin in L-askorbat peroksidaza. Našli smo precej literature, ki priča o povišanem izražanju teh proteinov pod vplivom neugodnih biotskih in abiotskih dejavnikov (med drugimi tudi slanosti). Sundaram in sod. so leta 2008 karakterizirali 11 glutaredoksinov, ki se odzivajo na abiotske stresne faktorje. Mittler in sod. (1994) sta dokazala s poskusi na grahu (*Pisum sativum*), da pride do povečanega izražanja gena ali genov, ki kodirajo za askorbat peroksidazo, kot odgovor na pomanjkanje vode, torej osmotski stres. Mittova et al. (2003) so s poskusi na paradižniku (*Solanum lycopersicum*) dokazali, da izražanje gena za glutathion S-transferazo pozitivno regulira slanost. Med drugim so zabeležili splošen dvig z glutathionom povezanega obrambnega metabolizma pri rastlinah, ki so bile izpostavljene povišani slanosti. Slanost je pozitivno regulirala tudi dve Cu-Zn superoksidni dismutazi (SOD), Mn superoksidno dismutazo in dve katalazi, katere razstrupljajo RKZ. Mittler in sod. so leta 1994 s poskusi na grahu dokazali, da pride do povečanega izražanja gena ali genov, ki kodirajo Cu/Zn SOD, kot odgovor na pomanjkanje vode. Tudi s poskusi na rižu (*Orzya sativa*) so dokazali, da slanost izzove povišano izražanje Mn in Cu/Zn superoksidne dismutaze (Fadzilla in sod., 1997). O odnosu med katalazo in povišano slanostjo pa poroča Demiral s sod. (2005), kateri so zabeležili povišano izražanje katalaze v riževih koreninah (*Orzya sativa*) kot odgovor na povišane vrednosti soli v okolju. Med pozitivno reguliranimi proteini smo zasledili tudi regulatorni delec 26S proteosoma. Ekstremne razmere v okolju pogosto sprožijo produkcijo

prostih kisikovih zvrsti, kar lahko povzroči poškodbe in denaturacijo proteinov. Zato je odstranjevanje poškodovanih proteinov s pomočjo ubikvitin-26S proteosomalne metabolne poti ključnega pomena za preživetje (Smalle in Viestra, 2004). Zasedili smo izražanje dveh molekularnih šaperonov, članov "Heat Shock" družine; in sicer Heat shock protein 82 in Heat shock protein 60. Za proteine te družine je splošno znano, da sodelujejo pri preprečevanju škode na proteinskih molekulah in obrambi organizma na vrsto dejavnikov abiotskega stresa.

Zadnji v tej skupini je protein, ki ga inducira osmotski stres in sodeluje pri sintezi rafinoznih oligosaharidov, kateri naj bi blažili posledice okoljskega stresa na rastline. Pripadniki te družine in z njimi povezani encimi so najbolj raziskani v semenih, kjer ščitijo celično integriteto med dehidracijo in imbibicijo, podaljšujejo vitalnost semen v dehidriranem stadiju in preskrbujejo celice s substrati, potrebnimi za generacijo energije med kalitvijo (Downie in sod., 2003). Galaktinol sintaza (GOLS) je prvi encim v metabolni poti biosinteze rafinoznih oligosaharidov. Pri našem poskusu smo opazili, da je bil v prisotnosti slanosti pozitivno reguliran. Akumulacijo tega encima v rastlinah povezujejo z neugodnimi okoljskimi pogoji, kot so visoke in nizke temperature ter dehidracija (Downie in sod., 2003). Taji in sod. so leta 2002 s poskusi na navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) dokazali, da tri gene, ki kodirajo za različne izoforme GOLS, inducirajo prisotnost nizkih temperatur, visoke slanosti, ABA in pomanjkanje vode.

6.2.6 Proteini, ki sodelujejo pri regulaciji rasti in ekspanzije

Opazili smo močnejšo izražanje proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji celične stene in podaljševanju korenin. Mnogo proteinov iz družine ekspanzinov je bilo novo izraženih. Colmer in sod. (2004) pričajo o pozitivni regulaciji izražanja ekspanzinov pod vplivom oksidativnega stresa (ki vsekakor je posledica visoke slanosti). Ti so aktivni pri kislem pH-ju in tanjšajo celično steno s prekinitvijo vodikovih vezi med polisaharidnimi komponentami celične stene. Glede na to, da prisotnosti NaCl v prsti viša pH v apoplastu, ni jasno, kako lahko ekspanzini, ki so aktivni pri kislem pH-ju, izvršujejo svojo funkcijo. Lahko predvidevamo, da slanost pozitivno regulira izražanje protonskih črpalk, ki zakisajo apoplast

in tako ustvarijo ugodne pogoje za delovanje ekspanzinov. Proteina, podobnega celulozni sintazi in saharozni sintazi (že omenjena) sodelujeta pri sintezi celične stene. Ko rastlina zazna osmotski stres oziroma fiziološko sušo, aktivira metabolne poti, ki omogočajo hitro rast korenin v dolžino. Šimonovičova in sod. (2004) so preučevali odziv ječmenovih korenin na slanost. Na podlagi svojih rezultatov sklepajo, da verjetno zgodnji stadiji suše spodbujajo podaljševanje korenin. Glede na to, da so rastline sesilni organizmi, na tak način povečujejo možnost, da najdejo vodo. Inhibicijo rasti korenin lahko opazimo po daljši izpostavljenosti slanosti. Tudi Munns (2002) meni, da je večina genov, ki se hitro odzovejo na prisotnost povečane slanosti, povezana s specifičnim odgovorom na sušo in ne na slanost. Tudi mi smo ob odstranitvi rastlin iz 500 mM NaCl raztopine po 6-ih urah opazili, da so bile korenine teh rastlin občutno daljše od kontrolnih.

Peroksidaza je encim, ki ga najdemo v peroksisomih in na ekstracelularni strani plazmaleme ter sodeluje pri procesih fotorespiracije in reorganizacije celične stene. Je oksidaza, ki katalizira prečno povezovanje med fenolnimi skupinami in proteini celične stene, pektini in ostalimi polimeri, sodeluje tudi pri sintezi lignina. S-adenozil metionin sintetaza sodeluje pri biosintezi lignina in se odziva na stres. Sodeluje pri sintezi prekurzorjev za biosintezo etilena (Espartero in sod., 1994). Ena izmed lis je predstavljala fenilalanin-amonijakovo liazo, ki katalizira prvo reakcijo v biosintezi fenilpropanoidnih produktov, med njimi tudi lignina, flavonoidov, fitoaleksinov. Ta encim ponavadi povezujejo z biotskim stresom. Ta rezultat lahko razumemo kot povišano potrebo po ligninu zaradi elongacije koreninskih celic ali pa proizvodnje fenolnih substanc, ki lahko delujejo kot antioksidanti in tako poskušajo razstrupljati RKZ.

Uspešno smo potrdili delovne hipoteze, saj smo z izdelavo gelov pokazali, da lahko z dvo-dimenzionalno elektroforezo ločimo proteine, ki so zastopani v ječmenovih koreninah. Prav tako smo s primerjavo kontrolnega gela in gela z vzorcem, ki je bil izpostavljen ekstremnim pogojem (500 mM NaCl, 6 ur), opazili spremembe v izražanju proteinskih slik. Analize dvo-dimenzionalnih gelov so nam razkrile identiteto nekaterih proteinov, katere smo lahko uvrstili v predpostavljene funkcionalne skupine, in sicer proteine, ki sodelujejo pri vzdrževanju

homeostaze, regulaciji rasti in ekspanzije ter kontroli in popravljanju škode (povzeto po Zhu, 2002). Poleg tega smo opazili tudi proteine, povezane z energijskim metabolizmom in asimilacijo dušika. Slednji dve skupini nedvomno sodelujeta pri odgovoru na slanost, vendar jih večina avtorjev, ki preučuje specifičen odgovor na slanost, ne izpostavlja. Drugi menijo, da je bioenergetska fleksibilnost pomembna pri aklimatizaciji rastlin na stresne razmere in bi ji bilo potrebno posvetiti več pozornosti (Dobrota, 2006). Munns v članku iz leta 2002 opozarja na pomembnost raziskav fiziologije korenin in odgovora na povečano slanost, saj je bilo narejenih presenetljivo malo raziskav na tem organu. Pa vendar nekatera dejstva odpirajo zanimiva vprašanja. Korenine so v neposrednem stiku s soljo ampak kljub temu niso najbolj prizadet rastlinski organ. Ionski status korenin je relativno ugoden in se le malo spreminja s časom. Inhibicija rasti je bolj očitna na nivoju poganjkov kot korenin.

7 POVZETEK

Po pregledu novo-nastalih proteinov pod poskusnimi pogoji lahko podamo naslednje zaključke. Med proteini, ki smo jih uspeli identificirati s pomočjo vizualne analize gelov, lahko opazimo, da jih največ pripada skupini, ki nadzoruje in popravlja škodo ter skupini, ki nadzoruje rast in ekspanzijo celic. Ker povišana slanost vodi v oksidativni stres, rastlina vložiti veliko energije za sintezo novih antioksidantov in encimov, ki razstrupljajo RKZ. Z izražanjem encimov, ki skrbijo za reorganizacijo celičnih sten (ekspanzini) in sintezo lignina (fenilalanin-amonijakova liaza, peroksidaza, S-adenozil metionin sintetaza, celulozna sintaza, saharozna sintaza) rastlina omogoča hitro podaljšanje korenin na račun podaljševanja koreninskih celic (in ne na račun celične delitve). Zasledili smo izražanje proteinov, ki skrbijo za ohranjanje homeostaze, med njimi kalijev kanal, lipoksigenazo, alen oksid sintazo, specifični cis regulator osmotskega stresa, PIB protein in proteinski produkt gena, ki se odziva na gravitacijo. Sinteza novih encimov, ki zagotavljajo prisotnost z energijo bogatih molekul in asimilacijo ter reciklacijo dušika, prav tako pripomorejo k sposobnosti rastline preživeti neugodne razmere. Tako skrbijo za povišan dotok energije in osnovnih gradbenih enot za sintezo obrambnih biomolekul.

8 LITERATURA

Agrawal G., Rakwal R. 2005. Rice proteomics: a cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrometry Reviews* 25: 1-53

Banker G. A. in Cotman C. W. 1972. Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 247: 5856-5861

Blayoc A. D. 1994. Soil salinity, salt tolerance and growth potential of horticultural and landscape plants. University of Wyoming, Cooperative Extension Service B988

Chen X., Wang Y., Li J., Jiang A., Cheng Y., Zhang W. 2009. Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 407-415

Chew O., Whelan J., Millar A. H. 2003. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 46869-46877

Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J. K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sciences* 45: 437-448

Colmer T. D., Peeters A. J. M., Wagemaker C. A. M., Vriezen W. H., Ammerlaan A., Voesenek L. A. C. J. 2004. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O₂ deficiency in *Rumex palustris*. *Plant Molecular Biology* 56: 423-437

Conte B., Braglia R., Basile A., Costaldo Cobiانchi R., Forni C. 2007. Proteomics and Bryophytes: a comparison between different methods of protein extraction to study protein synthesis in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* (Hedw.). *Caryologia* 60: 102-105

Costa P., Bahrman N., Frigerio J. M., Kremer A., Plomion C. 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology* 38: 587-596

De Pinto M. C., De Gara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 408: 2559-2569

Demiral T., Türkan I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257

Dobrota C. 2006. Energy dependant plant stress acclimation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5: 243-251

Downie B., Gurusinghe S., Dahal P., Thacker R. R., Snyder J. C., Nonogaki H., Yim K., Fukunaga K., Alvarado V., Bradford K. J. 2003. Expression of a galactinol synthase gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiology* 131: 1347-1359

Dubois F., Terce-Laforgue T., Gonzalez-Moro M. B., Estavillo J. M., Sangwan R., Gallais A., Hirel B. 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 565-576

Espartero J., Pintor-Toro J. A., Pardo J. M. 1994. Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology* 25: 217-227

Fadzilla N. M., Finch R. P., Burdon R. H. 1997. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany* 48: 325-331

Fang Z., Kamasani U., Berkowitz G. A. 1998. Molecular cloning and expression characterization of a rice K⁺ channel subunit. *Plant Molecular Biology* 37: 597-606

Fernandes F. M., Arrabaca M. C., Carvalho L. M. M. 2004. Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress. *Biologia Plantarum* 48: 317-319

Finnie C., Svensson B. 2009. Barley seed proteomics from spots to structures. *Journal of Proteomics* 72: 315-324

Foyer C. H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875

Goyal A. 1987. Effects of water stress on glycolate metabolism in the leaves of rice seedlings (*Oryza sativa*). *Physiol. Planta* 69: 289-294

Guerrier G. 1988. Hydrolytic activities and metabolite contents during the germination of species sensitive or tolerant to NaCl. *Agrochimica* 32: 463-481

Hashiguchi A., Ahsan N., Komatsu S. 2009. Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2009.07.033

Healthcare GE, 2004. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. Nemčija. Technical University of Munich.

Huang J., Zhang H., Wang J., Yang J. 2003. Molecular cloning and characterization of rice 6-phosphogluconate dehydrogenase gene that is up-regulated by salt stress. *Molecular Biology Reports* 30: 223-227

Hurkman W. J., Tanaka C.K. 1987. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiology* 83: 517-524

Hurkman W. J., Tanaka C.K., DePoint F. M. 1988. Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: a comparison using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 9: 781-787

Islam N., Lonsdale M., Upadhyaya N. M., Higgins T. J., Hirano H., Akhurst R. 2004. Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. *Proteomics* 4: 1903-1908

Joshee N., Kisaka H., Kitagawa Y. 1998. Isolation and characterization of a water stress-specific genomic gene, *pws1* 18, from rice. *Plant Cell Physiology* 39: 64-72

Katsuhara M., Shibasaka M. 2000. Cell death and growth recovery of barley after transient salt stress. *Journal of Plant Research* 113: 239-243

Kaur S., Gupta A. K., Kaur N. 2003. Effects of kinetin on starch and sucrose metabolising enzymes in salt stressed chickenpea seedlings. *Biologia Plantarum* 46: 67-72

Kim S. G., Kim S. T., Kang S. Y., Wang Y., Kim W., Kang K. Y. 2007. Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. *Plant Cell Reports* 27: 363-375

Koller A., Washburn M. P., Lange B. M., Andon N. L., Deciu C., Haynes P. A., Hays L., Schieltz D., Ulaszek R., Wei J., Wolters D., Yates III J. R. 2002. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States* 99: 11969-11974

Komatsu S., Kojima K., Suzuki K., Ozaki K., Higo K. 2004. Rice Proteome Database based on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: its status in 2003. *Nucleic Acids Research* 32: D388-D392, <http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/>

Kong Y., Zhou G., Wang Y. 2000. Physiological characteristics and alternative respiratory pathway under salt stress in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 595-600

Krishnaraj S., Thorpe T. A. 1996. Salinity stress effects on [¹⁴C-1]- and [¹⁴C-6]-glucose metabolism of a salt-tolerant and salt-susceptible variety of wheat. *International Journal of Plant Sciences* 157: 110-117

Kumar R. G., Shah K., Dubey R. S. 2000. Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science* 156: 23-34

Kwon S. T., Oonu K. 1992. Gravity responsive protein and mRNA related to the survival of rice (*Oryza sativa* L.) from gravity stress. *The Japanese Journal of Genetics* 67: 321-334

Leksikon rastlinskih bogastev, 1993. 1 izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 261 str.

Liu W., Fairbairn D. J., Reid R. J., Schachtman D. P. 2001. Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiology* 127: 283-294

Loulakakis C. A., Roubelakis-Angelakis K. A. 2001. Nizozemska, Kluwer Academic Publishers, Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine, 59 str.

McIntosh L., Eichler T., Gray G., Maxwell D., Nickels R., Wang Y. 1998. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365: 278-284

Mittler R., Zilinskas B. A. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5: 397-405

Mittova V., Theodoulou F. L., Kiddle G., Gomez L., Volokita M., Tal M., Foyer C. H., Guy M. 2003. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *Federation of European Biochemical Societies, Letters* 554: 417-421

Monribot C. in Boucherie H. 2000. Two-dimensional electrophoresis with carrier ampholytes. V: *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Rabilloud (ur.). Nemčija, Springer. 3. poglavje

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250

Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681

O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021

Ozturk Z. N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C. B., Galbraith D. W., Gozukirmizi N., Tuberosa R., Bohnert H. J. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48: 551-573

Panter S., Dickman M. 2004. Programmed cell death in plants during development and stress responses. *Cell Engineering* 4: 107-152

Plaxton W.C. 2002. Metabolic flexibility helps plants to survive stress. Web-essay
(www.plantphys.net)

Riccardi F., Gazeau P., Vienne D., Zivy M. 1998. Protein changes in responses to progressive water deficit in maize. *Plant Molecular Biology* 39:739-748

Rizhsky L., Liang H., Mittler R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151

Purcino A. A. C., Arellano C., Athwal G. S., Huber S. C. 1998. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. *Maydica* 43: 83-94

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*. *The Plant Journal* 44: 653-668

Szabolcs I. 1989. *Salt-Affected Soils*. Boca Raton, FL: CRC Press Florida: 274 str.

Shi H., Ishitani M., Kim C., and Zhu J. K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proceedings of National Academy of Sciences USA 97: 6896–6901

Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. The Plant Cell 14: 465–477

Smalle J., Viestra R. D. 2004. The ubiquitin 26S proteolytic pathway. Annual Review of Plant Biology 55: 555–590

Su H., Golldack D., Zhao C., Bohnert H. J. 2002. The expression of HAK-type K⁺ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. Plant Physiology 129: 1482–1493

Sundaram S., Wu S., Ghosh P., Rathinasabapathi B. 2008. Glutaredoxin-mediated oxidative stress protection to improve stress tolerance in vegetable crops. Hortscience 43: 1080

Šimonovičova M., Huttova J., Mistrik I., Široka B., Tamas L. 2004. Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions. Plant Growth Regulation 44: 267-275

Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 29: 417-426

Tester M., Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Annals of Botany 91: 503-527

Timperio A. M., Egidio M. G., Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71: 391-411

Uozumi N., Kim E. J., Rubio F., Yamaguchi T., Muto S., Tsuboi A., Bakker E. P., Nakamura T., Schroeder J. I. 2000. The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* 122: 1249-1259

Vincent D., Zivy M. 2007. Plant proteome responses to abiotic stress. V. *Plant Proteomics*. Šamaj J. in Thelen J. (ur.) Springer. 21. poglavje

Walia H., Wilson C., Wahid A., Condamine P., Cui X., Close T. J. 2006. Expression analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) during salinity stress. *Functional and Integrative Genomics* 6: 143-156

Walworth J. 2006. Soil structure: the roles of sodium and salts. The University of Arizona, neobjavljeni podatki.

Wang Z. X., Yano M., Yamanouchi U., Iwamoto M., Monna L., Hayasaka H., Katayose Y., Sasaki T. 1999. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *The Plant Journal* 19: 55-64

Wilkins M. R., Williams K. L., Appe R. D., Hochstrasser D. F. 1997. Berlin, Springer. *Proteome Research: New frontiers in functional genomics*.

Williams B., Dickman M. 2008. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Molecular Plant Pathology* 9: 531-544

Witzel K., Weidner A., Surabhi G. K., Borner A., Mock H. P. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany* 60: 3545-3557

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6: 251-264

Zhu J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53:247-73

Zhu J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445.

9 ZAHVALA

V tem poglavju se želim zahvaliti vsem tistim, ki so mi pomagali k uspešnem zaključku študija. Naj se najprej zahvalim somentorju prof. Sergiu Espositu, ki me je gostil v svojem laboratoriju in mi pomagal pri obdelavi podatkov. Posebna zahvala moji mentorici, prof. dr. Marjani Regvar, ki mi je s svojim profesionalnim pristopom in pozitivnim realizmom povrnila delovni elan in mi svetovala pri pisanju diplomske naloge. Želim se zahvaliti tudi recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu, ki mi je natančno pregledal diplomsko nalogo. Vsem zgoraj naštetim se zahvaljujem tudi za vse konstruktivne kritike, iz katerih sem se veliko naučila.

Za dostopnost, spodbudo in pomoč pri organizaciji študentske izmenjave v okviru programa Erasmus in diplomskega dela, se najlepše zahvaljujem koordinatorki za Erasmus izmenjave za področje Biologije na Biotehniški fakulteti, prof. dr. Jasni Štrus, in Erasmus koordinatorki iz neapeljske univerze, prof. dr. Lauri Fucci.

Lepa hvala tudi Myriam Ferrara in Stefaniji Montanari za strokovno pomoč pri eksperimentalnem delu ter Claudiji Zingaretti za gostoljublje v svojem laboratoriju. Vsem trem pa se najlepše zahvaljujem za dobro družbo, prijazne obraze in simpatične šale. Hvala ekologom in mikrobiologom z oddelka »Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale« neapeljske univerze »Federico II«, ki so mi prijazno dovolili uporabo laboratorijske opreme.

Nazadnje se želim zahvaliti vsej moji družini v širšem smislu, posebno moji mami za podporo in spodbudo tekom celotnega študija. Fantu Rosariju se zahvaljujem za neomajno podporo in za vse, česar me je naučil. Pristrčna hvala vsej družini Micillo, ki me je prijazno sprejela in polepšala ter olajšala bivanje v najlepšem mestu pod Vezuvom. Lepa hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem, s katerimi smo soustvarjali spomine na enkratna študijska leta. Posebna zahvala gre Maji Pavlin in Mateji Pavčnik, ki sta mi prostovoljno in dobrodušno priskočili na pomoč, ko sem jo potrebovala. Za lektoriranje diplomske naloge se zahvaljujem Vidi Povšič.