

Zmiany w proteomie liści linii DH jęczmienia ozimego wywołane niedoborem wody w podłożu



Przemysław Kopeć¹, Gabriela Gołębiowska-Pikania², Monika Krzewska¹, Iwona Żur¹, Ewa Dubas¹, Anna Nowicka¹, Tomasz Hura¹, Sabina Malaga¹

¹Institut Fizjologii Roślin *im. F. Górskiego*, PAN w Krakowie

²Institut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny *im. Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie

WSTĘP

Jęczmień ozimy (*Hordeum vulgare* L.) jest szczególnie wrażliwy na niedobór wody pojawiający się w trakcie kłoszenia. Wystąpienie suszy glebowej w okresie wzmożonego zapotrzebowania na wodę u roślin uprawnych przyczynia się do obniżenia ich plonowania oraz pogorszenia jakości plonu.

Celem podjętych badań była identyfikacja białek zaangażowanych w reakcje obronne uruchamiane w odpowiedzi na stres suszy glebowej występujący w fazie kłoszenia jęczmienia ozimego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiło 10 linii podwojonych haploidów (DH) jęczmienia ozimego wyprowadzonych metodą kultur pylnikowych z polskich materiałów hodowlanych. Po osiągnięciu fazy kłoszenia przez rośliny stres suszy symulowano, w warunkach szklarniowych, poprzez obniżenie wilgotności podłoża do 35% ppw, względem kontroli rosnącej przy 75% ppw. Po 3 tygodniach trwania deficytu wody przeprowadzono pomiary wybranych parametrów fizjologicznych (tj. zawartości wody w liściach, fluorescencji chlorofilu a, przewodności szparkowej), na których podstawie linie DH podzielono na 3 grupy: linie tolerancyjne, linie o pośredniej wrażliwości oraz linie wrażliwe. W tym samym czasie zebrano również liście do analiz proteomicznych.

Mieszaninę białek wyekstrahowanych z liści metodą fenolową, rozdzielono wykorzystując elektroforezę dwuwymiarową (2D-PAGE). W pierwszym wymiarze białka rozdzielono według wartości ich punktu izoelektrycznego z użyciem pasków żelowych IPG pH 4-7 (17 cm). Drugi wymiar elektroforezy prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym, dokonując separacji białek względem ich masy cząsteczkowej. Białka wizualizowano poprzez barwienie CBB (ang. *Coomassie Brilliant Blue*). Uzyskane elektroforegramy analizowano pod względem poziomu akumulacji białek przy użyciu programu PDQuest. Wybrane białka zidentyfikowano z użyciem spektrometru MALDI ToF i oprogramowania MASCOT.

WYNIKI

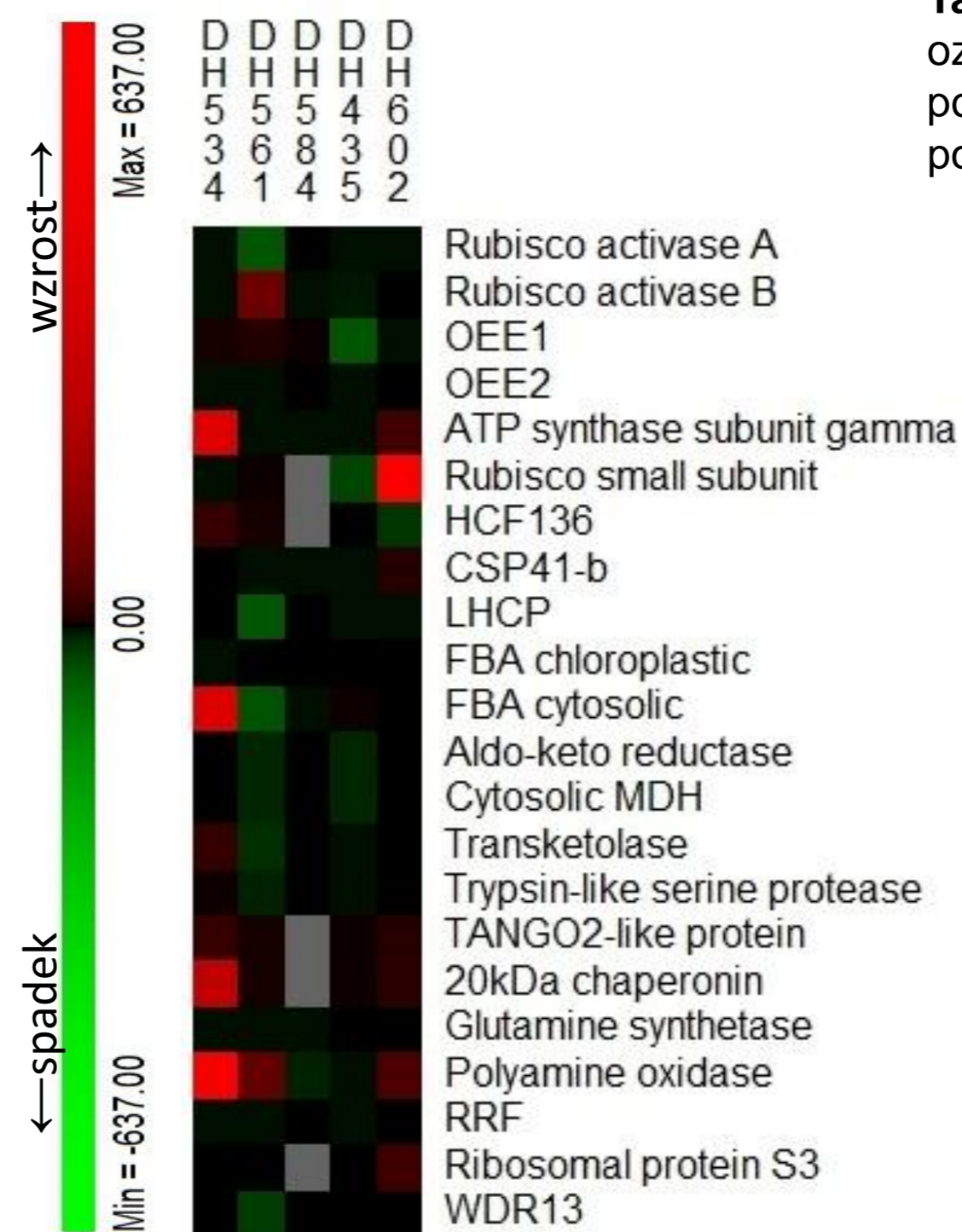
Deficyt wody w podłożu wywołał zmiany w poziomie akumulacji niektórych białek u wszystkich linii DH jęczmienia ozimego – obserwowano zarówno ich wzrost, jak i spadek w stosunku do roślin rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (tab. 1).

Porównania map proteomów liści jęczmienia pochodzących z roślin poddanych działaniu stresu suszy i optymalnie nawodnionych wykazały zmiany w poziomie akumulacji 22 białek (ryc. 1). Obserwowane istotne zmiany wahały się od bardzo małych ($\pm 1,5$ krtonie) do bardzo dużych (+637x).

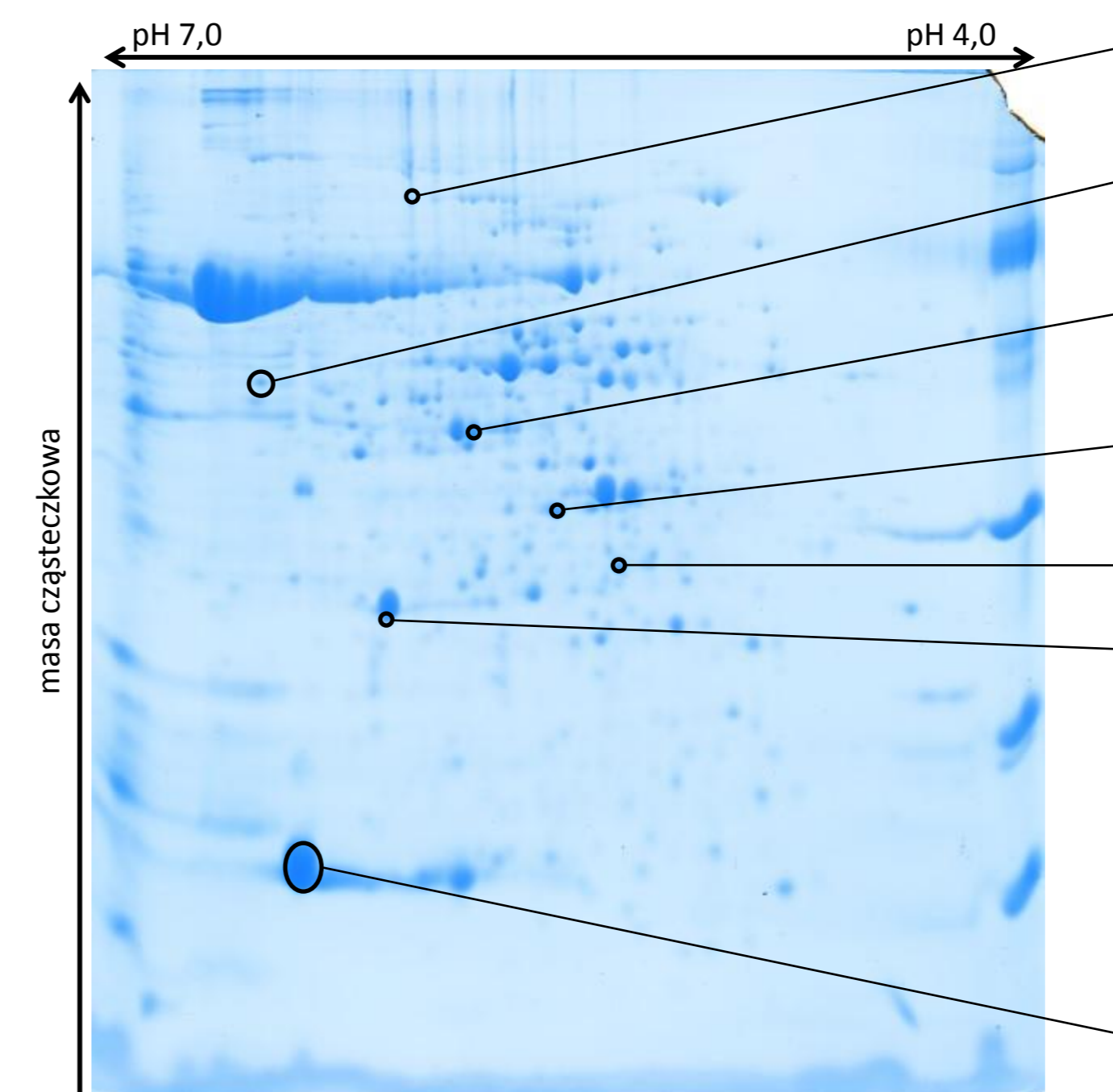
Porównanie zmian ilościowych w proteomach liści linii DH tolerancyjnych z wrażliwymi (6 porównań) wskazało na zmiany poziomu akumulacji 30 białek po 3 tygodniach trwania suszy glebowej (tab. 2). Pośród zidentyfikowanych białek najwięcej było tych uczestniczących w fotosyntezie roślin (37%; ryc. 3). Liczną grupę stanowiły również białka zaangażowane w metabolizm węglowodanów (21%) oraz biosyntezę białek (21%). Pozostałe zidentyfikowane białka pełnią funkcje w reakcjach obronnych (9%), metabolizmie wtórnym, metabolizmie aminokwasów, regulacji metabolizmu oraz stanowią element cytoszkieletu.

Tab. 1. Zmiany ilościowe białek w liściach linii DH jęczmienia ozimego indukowane w odpowiedzi na suszę glebową

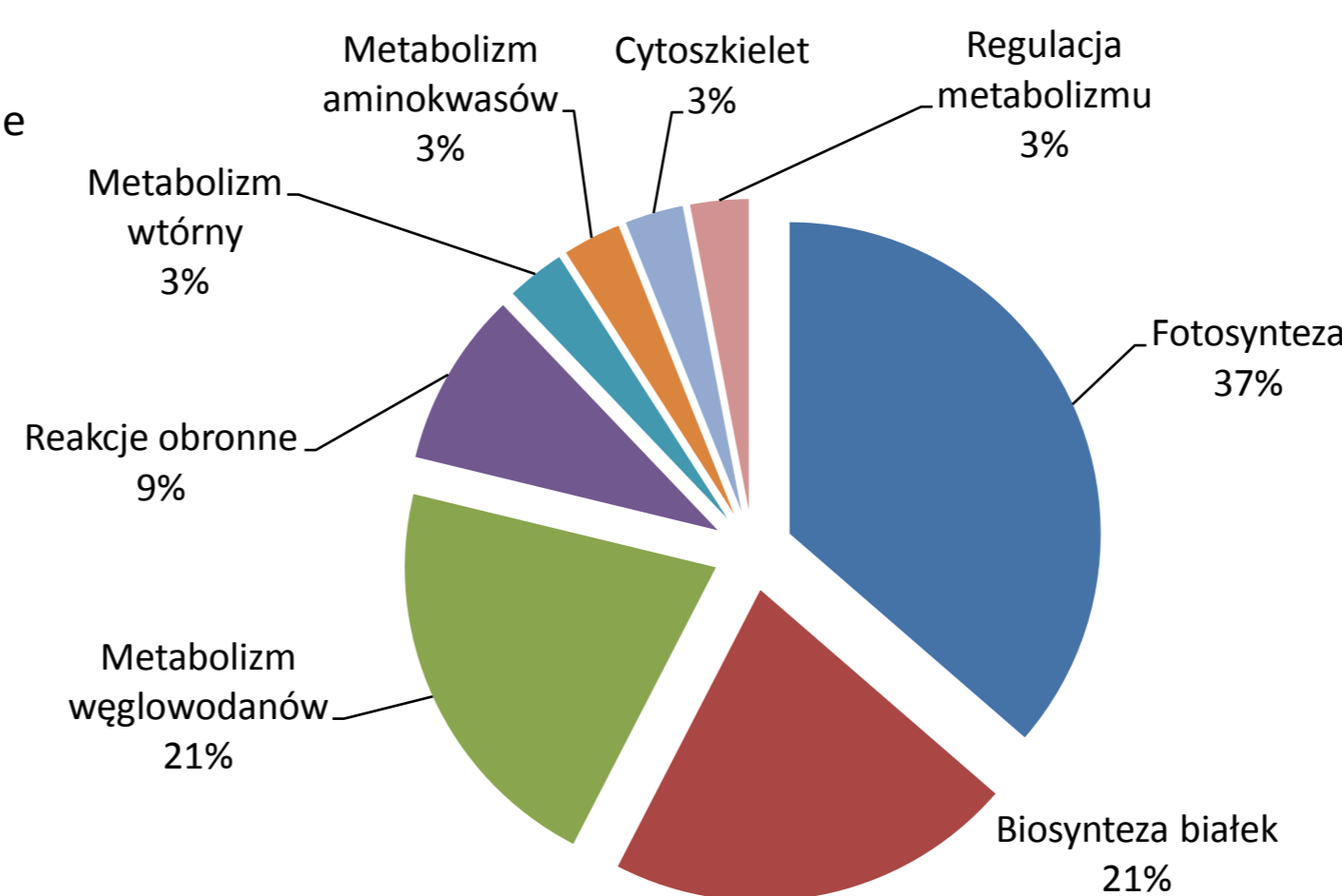
Linie DH	Ilość białek różnicujących	Min. 2-krotny wzrost akumulacji	Min. 2-krotny spadek akumulacji
Tolerancyjne linie DH			
DH534	16	6	10
DH561	10	6	4
DH584	14	9	5
Linie DH o pośredniej wrażliwości			
DH363	17	4	13
DH65	6	2	4
DH61	8	2	6
DH158	14	8	6
DH575	13	7	6
Wrażliwe linie DH			
DH602	19	7	9
DH435	19	9	10



Ryc. 1 Zmiana poziomu akumulacji zidentyfikowanych białek linii DH po 3 tygodniach trwania suszy glebowej względem roślin optymalnie nawodnionych.



Ryc. 2 Zdjęcie żelu poliakrylamidowego z wybarwionymi białkami pochodzącymi z liścia rośliny (DH602) poddanej działaniu stresu suszy glebowej.



Ryc. 3 Klasyfikacja funkcjonalna białek, których stężenie w tkankach liści roślin rosnących w warunkach deficytu wody różnicowało linie DH o różnym poziomie wrażliwości na suszę glebową

Tab. 2 Zidentyfikowane białka jęczmienia ozimego, których poziom akumulacji ulegał zmianie pod wpływem niedoboru wody w podłożu w porównaniach linii DH tolerancyjnych z wrażliwymi

Zidentyfikowane białka	Zmiany ilościowe białek w 6 porównaniach tolerancyjnych linii DH z liniami wrażliwymi	
	Obecność w 6 porównaniach	Poziomy zmiany akumulacji
Rubisco activase A	2↑ 2↓	10-33x; 3-4x
Rubisco activase B	5↓	1,5-2x
Oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1)	3↑ 2↓	2,5x; 4-5x
Oxygen-evolving enhancer protein 2 (OEE2)	1↑ 5↓	1,5x; 1,5-4x
ATP synthase subunit gamma	3↑ 1↓	2-18x; 33x
Glutamine synthetase	1↑ 3↓	1,5x; 2-4x
Photosystem II stability/assembly factor HCF136	3↓	2-33x
Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa (CSP41-b)	1↑ 3↓	1,5x; 1,5-33x
Chlorophyll a-b binding protein (LHCP)	4↓	2-100x
Transketolase	6↑	1,5-20x
Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic (FBA cytosolic)	4↓	2-25x
Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic (FBA chloroplastic)	2↑ 3↓	1,5x; 2x
Glutathione S-transferase	2↑ 3↓	2x; 2-7x
Polyamine oxidase	2↑ 3↓	1,5-2x; 1,5-2x
Ribosome-recycling factor (RRF)	1↑ 5↓	1,5x; 1,5-4x
Transport and Golgi organization 2-like protein (TANGO2-like protein)	3↓	12-144x
20 kDa chaperonin	1↑ 4↓	5x; 1,5-100x
Rubisco small subunit	2↑ 4↓	2-50x; 6-130x
Aldo-keto reductase	2↑ 3↓	6-15x; 2-33x
Trypsin-like serine protease	1↑ 3↓	1,5x; 3-10x
Ribosomal protein S3	4↓	1,5-33x
WD repeat-containing protein 13 (WDR13)	3↓	1,5-50x
2-methylene-furan-3-one reductase	2↑	1,5x
Triosephosphate isomerase	4↓	10-20x
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	3↑ 3↓	3-22x; 1,5-50x
Ferredoxin-NADP reductase	2↑ 1↓	2-10x; 32x
Cytosolic malate dehydrogenase (Cytosolic MDH)	1↑ 3↓	6x; 1,5-25x
Actin	3↑ 3↓	1,5-2x; 1,5-8x
Haloacid dehalogenase-like hydrolase	2↑ 3↓	1,5x; 2-18x
50S ribosomal protein L19-1	2↑ 2↓	1,5x; 3-5x

PODSUMOWANIE

Deficyt wody w podłożu w fazie kłoszenia jęczmienia ozimego, niezależnie od wrażliwości linii DH, wywoływał zmiany w proteomie liści roślin. Obserwowane różnice miały charakter ilościowych. Zidentyfikowane białka różnicujące tolerancyjne linie DH od wrażliwych wskazywały na szczególne znaczenie prawidłowego funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego, biosyntezy białek oraz metabolizmu węglowodanów.

Identyfikacja czynników determinujących tolerancję jęczmienia ozimego na niedobór wody pozwoli na poznanie mechanizmu tego procesu oraz późniejsze opracowanie biomarkerów selekcji roślin.