

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK

Zakład Biochemii Produktów Naturalnych



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Zmiany profilu białkowego korzenia w liniach populacji mapującej
jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) w warunkach niedoboru wody**

Klaudia Chmielewska

Promotor

dr hab. Paweł Bednarek, prof. IChB PAN

POZNAŃ 2015

*Dziękuję promotorowi
Dr hab. Pawłowi Bednarkowi
za pomoc i cenne uwagi przekazane podczas pisania niniejszej pracy,
a także za okazaną życzliwość i wyrozumiałość*

*Serdeczne powiędzowania składam także swojemu Opiekunowi Naukowemu
Prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu
za nieocenioną pomoc i wsparcie merytoryczne podczas realizacji pracy,
a także za okazaną życzliwość i cierpliwość*

*Dziękuję także **dr Łukaszowi Marczakowi**
za wsparcie merytoryczne oraz wiele cennych uwag*

*Szczególne podziękowania składam Pracownikom
Zakładu Biochemii Produktów Naturalnych,
a w szczególności **Basi Swarczewicz, Ani Wojakowskiej,
Karolinie Kułak i Pawłowi Rodziewiczowi**
za wspaniałą atmosferę pracy*

*Podziękowania składam **Prof. dr hab. Pawłowi Krajewskiemu**
z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki
Instytutu Genetyki Roślin PAN
za pomoc w przeprowadzeniu analiz statystycznych
i opracowaniu wyników*

Pracę dedykuję Mężowi oraz Rodzicom

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE	10
1.1. Jęczmień, charakterystyka gatunku.....	10
1.1.1. Produkcja jęczmienia i jego znaczenie gospodarcze.....	11
1.2. Stresy abiotyczne	12
1.2.1. Reakcje roślin na stres abiotyczny	12
1.2.2. Stres suszy	14
1.2.2.1. Mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na stres suszy.....	15
1.2.2.2. Odpowiedź roślin na stres suszy na poziomie ekspresji genów, białek i metabolitów.....	17
1.3. Proteomika roślinna	20
1.3.1. Podejście metodyczne stosowane w badaniach proteomów roślinnych.....	22
1.3.2. Elektroforeza dwukierunkowa.....	23
1.3.3. Spektrometria mas jako narzędzie analityczne wykorzystywane w proteomice.....	26
1.3.3.1. Identyfikacja białek metodami spektrometrii mas.....	27
1.3.3.2. Interpretacja wyników i bazy danych	31
1.3.4. Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do identyfikacji białek biorących udział w odpowiedzi na stres suszy	33
1.4. Metody hodowli roślin o zwiększonej tolerancji na stres suszy	37
2. CEL PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	41
3.1. Stosowane odczynniki.....	41
3.2. Materiał roślinny i warunki hodowli.....	44
3.3. Izolacja i oczyszczanie białek	45
3.4. Dwukierunkowa elektroforeza białek	46
3.4.1. Rozdział białek w pierwszym kierunku	47
3.4.2. Rozdział białek w drugim kierunku	48
3.5. Analiza statystyczna elektroforegramów	50
3.5.1. Całościowa analiza zmian profili akumulacji białek.....	52
3.6. Trawienie enzymatyczne białek	53

3.7.	Analiza białek metodami spektrometrii mas.....	54
3.7.1.	Identyfikacja białek w bazach danych.....	55
4.	WYNIKI.....	56
4.1.	Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych	56
4.2.	Analiza proteomiczna populacji mapującej jęczmienia.....	76
5.	DYSKUSJA.....	110
5.1.	Białka obronne	113
5.2.	Białka zaangażowane w metabolizm węgla.....	130
5.3.	Białka związane z regulacją ekspresji genów	134
5.4.	Białka związane z metabolizmem wtórnym	137
5.5.	Inne białka	138
5.6.	Zidentyfikowane białka a potencjalne biomarkery suszy	141
6.	WNIOSKI.....	144
7.	STRESZCZENIE	146
8.	LITERATURA	148
9.	SUPLEMENT.....	168



Przedłożona praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”. Priorytet 1., Działanie 1.3., Poddziałanie 1.3.1. Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. Nr projektu: UDA.POIG.01.03.01-00-101/08-00.

WYKAZ SKRÓTÓW

- ABA** – kwas abscysynowy (ang. *Abscisic Acid*)
- ABF** – czynniki wiążące się z ABRE (ang. *ABRE-binding factor*)
- ABRE** – element cis odpowiedzi na kwas abscysynowy (ang. *ABA-responsive element*)
- APX** – peroksydaza askorbinianowa (ang. *Ascorbate Peroxidase*)
- APX-GSH** – cykl askorbinianowo-glutationowy (ang. *Ascorbate-Glutathione Cycle*)
- ATP** – adenozy-no-5'-trifosforan (ang. *Adenosine Triphosphate*)
- BADH** – dehydrogenaza aldehydu betainowego (ang. *Betaine Aldehyde Dehydrogenase*)
- BiP** – białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego (ang. *Luminal Binding Protein*)
- CAM** – kwasowy metabolizm węgla gruboszowatych (ang. *Crassulacean Acid Metabolism*)
- CBB** – błękit Coomassie (ang. *Coomassie Brilliant Blue*)
- CID** – kolizyjnie indukowana dysocjacja (ang. *Collision Induced Dissociation*)
- COR** – geny odpowiadające na chłód (ang. *Cold Responsive*)
- Clp** – kazeino-lityczna proteaza serynowa (ang. *Caseino-lytic protease*)
- DHAR** – reduktaza dehydroaskorbinianowa (ang. *Dehydroascorbate Reductase*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *Deoxyribonucleic Acid*)
- DRE/CRT** - element cis odpowiedzi na odwodnienie (ang. *Dehydration Responsive Element/C-repeat*)
- DREB** – czynnik wiążący DRE (ang. *Dehydration Responsive Element Binding*)
- ECD** – rozpad z wychwytem elektronów (ang. *Electron Capture Dissociation*)
- eIF-4A** – eukariotyczny czynniki inicjacji 4A (ang. *Eukaryotic Initiation Factor-4A*)
- ERD1** – gen wczesnej odpowiedzi na odwodnienie (ang. *Early Responsive to Dehydration*)
- FAO** – Organizacja Stanów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- ESI** – jonizacja przez elektrorozpraszanie (ang. *Electrospray Ionization*)
- ETD** – rozpad z przeniesieniem elektronów (ang. *Electron Transfer Dissociation*)
- FT-ICR** – analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)
- GB** – betaina glicynowa (ang. *Glycine Betaine*),
- GST** – S-transferaza glutationowa (ang. *Glutathione S-transferase*),
- GTP** – guanozy-no-5'-trifosforan (ang. *Guanosine-5'-triphosphate*)
- HCA** – dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne (ang. *Hierarchical Clustering Analysis*)
- HSP** – białka szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Protein*)
- ICAT** – znakowanie izotopami wiążącymi cysteinę (ang. *Isotope-Coded Affinity Tag*)
- IEF** – izoelektroogniskowanie (ang. *Isoelectro Focusing*)
- iPGAM** – mutaza bisfosfoglicerynianowa niezależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu (ang. *2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase*)
- IT** – pułapka jonowa (ang. *Ion Trap*)

- iTRAQ** – znaczniki izobaryczne (ang. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*)
- LC** – chromatografia cieczowa (ang. *Liquid Chromatography*)
- LEA** – białka późnej embriogenezy (ang. *Late-embryogenesis Abundant Proteins*)
- MAB** – hodowla wspomagana markerami genetycznymi (ang. *Marker-Assisted Breeding*)
- MALDI** – desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)
- MDAR** – reduktaza monodehydroaskorbinianowa (ang. *Monodehydroascorbate Reductase*)
- MOWSE** – algorytm oparty o wyszukiwanie na podstawie masy molekularnej (ang. *Molecular Weight Search*)
- mRNA** – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. *Messenger Ribonucleic acid*)
- MS** – spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*)
- MS/MS** – tandemowa spektrometria mas (ang. *Tandem Mass Spectrometry*)
- MudPIT** – wielowymiarowa technika identyfikacji białek (ang. *Multidimensional Protein Identification Technology*)
- mQTL** – loci cech ilościowych związane z metabolitami (ang. *metabolic QTL*)
- NADPH** – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)
- NTP** – trifosforany nukleozydów (ang. *Nucleoside Triphosphate*)
- PAL** – amoniakolizaza fenyloalaniny (ang. *Phenylalanine Ammonia Lyase*)
- PCO** – analiza współrzędnych głównych (ang. *Principal Coordinates Analysis*)
- pI** – punkt izoelektryczny (ang. *Isoelectric Point*)
- PMF** – peptydowy odcisk palca (ang. *Peptide Mass Fingerprinting*)
- pQTL** – loci cech ilościowych związane z białkami (ang. *protein QTL*)
- P5CDH** – dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylianum (ang. *Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase*),
- P5CS** – syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylianu (ang. *Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase*)
- RAB** – geny odpowiadające na kwas abscysynowy (ang. *Responsive to Abscisic Acid*)
- RD** – geny odpowiadające na dehydratację (ang. *Responsive to Dehydration*)
- RIL** – rekombinacyjne linie wsobne (ang. *Recombinant Inbred Line*)
- ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*)
- RNA** – kwas rybonukleinowy (ang. *Ribonucleic Acid*)
- RuBisCO** – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (ang. *Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase*)
- SDS-PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- sHSP** – niskocząsteczkowe białko szoku cieplnego (ang. *small Heat Shock Protein*)
- SILAC** – znakowanie metaboliczne (ang. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture*)
- SIMRs** – odpowiedzi morfogenezy indukowane stresem (ang. *Stress-Induced Morphogenesis Responses*)
- SOD** – manganianowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. *Superoxide Dismutase*)

- TOF** – analizator czasu przelotu (ang. *Time of Flight*)
- UPGMA** – dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne wykonano metodą średnich odległości pomiędzy obiektami w skupieniach (ang. *Unweighted Paired Group Average Linkage*)
- UPR** – kaskada odpowiedzi na nieufałdowane białka (ang. *Unfolded Protein Response*)
- UPS** – system ubikwityna-proteasom (ang. *Ubiquitin-Proteasome System*)
- USP** – uniwersalne białka stresu (ang. *Universal Stress Proteins*)
- Q** – kwadrupol (ang. *Quadrupole*)
- QTL** – loci cech ilościowych (ang. *Quantitative Trait Locus*)
- 2D-LC** – dwuwymiarowa chromatografia cieczowa (ang. *Two-dimensional Liquid Chromatography*)
- 5'UTR** – rejon sekwencji nieulegającej translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1. Jęczmień, charakterystyka gatunku

Jęczmień (*Hordeum* L.) jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych roślin zbożowych, uprawianych zarówno przez wczesne cywilizacje, jak i w czasach współczesnych. Badania archeologiczne dowodzą, że jest jednym z pierwszych zbóż udomowionych przez człowieka. Przypuszcza się, iż pierwotny proces udamawiania i doskonalenia dzikich gatunków jęczmienia (*Hordeum spontaneum*) został zakończony około 9-10 tys. lat temu w rejonie „Żyznego Półksiężyca” (ang. *Fertile Crescent*), obejmującego iracki Kurdystan. Inne obserwacje archeologiczne sugerują, że pierwsze ślady upraw jęczmienia pochodzą z doliny Nilu w Egipcie i datowane są na 15 tys. lat (Nevo i in., 1986). Obecna systematyka botaniczna klasyfikuje jęczmień do rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), do plemienia pszenicowatych (*Triticeae*), a podplemienia jęczmieniowatych (*Hordeinea*). Rodzaj jęczmień dzieli się na dwa typy: ssp. *spontanea*, to formy dzikie o łamliwej osi kłosa i o ziarnie oplewionym oraz ssp. *cerealia*, formy uprawne, o osi kłosa niełamliwej, o ziarnie oplewionym lub nagim. Wyróżnia się od 20 do 25 różnych gatunków jęczmienia. Gatunkiem typowym jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) oraz jego dwa podgatunki: jęczmień czterorzędowy (*Hordeum vulgare* ssp. *tetrastichon*) i sześciorzędowy (*Hordeum vulgare* ssp. *hexastichon*), które są najszerzej rozpowszechnionymi gatunkami uprawnymi (Gąsiorowski, 2010). Jęczmień jest diploidalnym, samopylnym gatunkiem, posiadającym 7 par chromosomów ($2n=2x=14$), o wielkości genomu równej 5.1 Gpz. Zakończone w roku 2012 prace nad poznaniem genomu jęczmienia pozwoliły na uzyskanie jego kompletnej mapy genetycznej, fizycznej i funkcjonalnej, określającej bezpośrednią lokalizację genów i innych sekwencji w genomie oraz odległości genetycznej pomiędzy nimi (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Porównanie sekwencji genów jęczmienia z genami ryżu, sorgo i *Brachypodium* wykazuje około 77% poziom zgodności ich sekwencji, co może sugerować o wysoce konserwatywnych ewolucyjnie sekwencjach nukleotydowych tych genomów (Mayer i in., 2011). Ze względu na krótki cykl życiowy (około 90 dni), łatwość hodowli w warunkach laboratoryjnych, stosunkowo duże zdolności adaptacyjne oraz dobrze poznane

cechy morfologiczne, fizjologiczne oraz genetyczne jęczmień stanowi częsty obiekt badawczy wśród roślin zbożowych.

1.1.1. Produkcja jęczmienia i jego znaczenie gospodarcze

Niezwykle ważnym surowcem w produkcji artykułów spożywczych są zboża, których wielkość arealów upraw systematycznie wzrasta. Jęczmień, ze względu na szerokie spektrum jego wykorzystania oraz stosunkowo niewielkie wymagania glebowe zajmuje dominującą pozycję wśród roślin uprawnych. W zależności od cech anatomicznych, morfologicznych i chemicznych ziarna, jęczmień znajduje odpowiednie przeznaczenie przemysłowe. Odmiany ozime wykorzystywane są przede wszystkim do celów paszowych i spożywczych, a formy jare dodatkowo do wytwarzania słodu w produkcji piwa i whisky. Najważniejszym ilościowo kierunkiem użytkowania jęczmienia jest produkcja pasz, stosowanych do skarmiania zwierząt (około 66% światowych upraw jęczmienia). W tym celu wykorzystywane są głównie odmiany pastewne, charakteryzujące się przede wszystkim wysoką zawartością białka w ziarniakach. Drugim ważnym kierunkiem użytkowania jest przemysł browarniczy, gdzie ziarno wykorzystywane jest jako surowiec do produkcji słodu jęczmiennego. Odmiany browarne muszą charakteryzować się niską zawartością białka oraz bardzo wysoką zdolnością kiełkowania. Łącznie około 32% upraw wykorzystywanych jest w przemyśle alkoholowym. Pozostałe 2% to wyrób produktów żywnościowych, takich jak kasze, płatki, czy mąki (Baik i Urlich, 2008; Gąsiorowski, 2010).

W wielkości produkcji światowej uprawy jęczmienia zajmują czwarte miejsce, po pszenicy, ryżu i kukurydzy. W roku 2012 uzyskano 132.4 miliona ton jęczmienia z światowego arealu upraw równego 49.3 miliona hektarów. Taki wynik stanowi 5.1 % światowej produkcji zbóż. Pod względem wielkości arealów oraz produkcji dominuje Europa, gdzie prowadzonych jest ponad 60% upraw jęczmienia. Główni producenci to Rosja (16.9 mln ton), Ukraina (9,1 mln ton), Francja (8.8 mln ton) i Niemcy (8.7 mln ton). Polska jest producentem 4.1 mln ton jęczmienia rocznie, co stanowi 3% światowej produkcji (<http://faostat.foa.org>). W skali krajowej jęczmień znajduje się w pozycji dominującej, obok pszenicy i żyta. W roku 2010 wielkość produkcji stanowiła 13% upraw zbożowych, natomiast w roku 2012 wzrosła do 15.2 % i zajmowała pozycję drugą, po

pszenicy. W strukturze zasiewów formy jare zajmują pozycję dominującą w stosunku do form ozimych (<http://stat.gov.pl>).

1.2. Stresy abiotyczne

Stresy abiotyczne stanowią główne czynniki środowiskowe silnie ograniczające wzrost, rozwój oraz produktywność roślin. Wpływają na zmianę procesów morfologicznych, fizjologicznych, a także biochemicznych i molekularnych zachodzących w komórkach roślinnych. Przyczyniają się do zaburzenia podstawowych procesów metabolicznych, co związane jest z trwałymi uszkodzeniami komórek, tkanek i organów, prowadzącymi do zahamowania wzrostu rośliny oraz redukcji plonów (Farooq i in., 2009; Athar i Ashraf, 2009; Barnabas i in., 2008). Szacuje się, że stresy abiotyczne są przyczyną spadków od 54 do 82% plonów w zależności od strefy klimatycznej. Według szacunków Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), około 26% światowych obszarów gleb narażonych jest na deficyt wody, natomiast około 20% ziem na wysokie zasolenie. Stresy suszy, zasolenia oraz ekstremalnych temperatur przyczyniają się do spadku około 50% plonów uprawianych roślin zbożowych (Bray i in., 2000; Rehman i in., 2005).

1.2.1. Reakcje roślin na stres abiotyczny

Rośliny w warunkach naturalnych narażone są na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych. Czynniki stresowe określane są jako siła działająca na organizm, wywołująca znaczące zmiany fizyczne oraz strukturalne, które prowadzą do zaburzenia lub zahamowania jego prawidłowego funkcjonowania. Czynniki stresowe (stresor), charakteryzowane są jako bodziec, natomiast reakcja stresowa lub stan stresowy to odpowiedź na zadany bodziec, jak również wynikający z niej stan dostosowania organizmu (Jones, 1989; Mahajan i in., 2005). Przebieg reakcji rośliny na działanie czynnika stresowego można podzielić na kilka następujących po sobie faz, określanymi mianem syndromu reakcji stresowej. Pierwsza, charakteryzowana jako faza alarmu, związana jest z destabilizacją strukturalną i funkcjonalną komórek, które uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Fazę alarmu zapoczątkowuje reakcja na stres, w

której procesy kataboliczne przeważają nad anabolicznymi, prowadząc do zaburzenia procesów metabolicznych, takich jak fotosynteza, czy oddychanie. Jeżeli natężenie bodźca się nie pogłębia, a roślina wyposażona jest w alternatywne drogi metaboliczne, następuje pobudzenie procesów naprawczych i wejście w fazę odporności. W czasie tej fazy następuje stabilizacja układu, dzięki czemu możliwa jest normalizacja stanu w warunkach działającego stresu (hartowanie). Jeżeli czynnik stresowy trwa zbyt długo lub zwiększa się jego intensywność, może dojść do fazy wyczerpania, podczas której roślina podatna jest na infekcje patogenami, co może prowadzić do nieodwracalnych uszkodzeń komórkowych, a w konsekwencji do śmierci rośliny (Larcher, 2003). Zaburzenia spowodowane czynnikiem stresowym mogą być odwracalne, jednak w przypadku jego dużej intensywności i/lub długotrwałego działania mogą stać się nieodwracalnymi. Powstające uszkodzenia mają charakter bezpośredni (strukturalny), przykładowo mogą dotyczyć zmian struktury błony komórkowej, które mogą być przyczyną powstawania uszkodzeń pośrednich (metabolicznych), związanych z zaburzeniami metabolicznymi, generowanymi na skutek zakłóceń enzymów zlokalizowanych w błonie komórkowej. Odpowiedź rośliny może być lokalna, co związane jest z reakcją określonych tkanek. Zaatakowana tkanka może przekazywać sygnał do innych części rośliny, co wzmacnia reakcję obronną i wówczas mówimy o odpowiedzi systemicznej (Larcher, 2003). Rośliny w celu przetrwania niekorzystnych warunków środowiskowych wykazują zdolności dostosowawcze, które pomagają im podtrzymywać funkcje życiowe podczas działania stresu lub podjąć te funkcje po jego ustąpieniu. Dostosowanie takie zachodzi w wyniku adaptacji lub aklimatyzacji. Aklimatyzacja jest procesem polegającym na modyfikacji struktury i funkcji osobnika podczas jego rozwoju osobniczego, w odpowiedzi na działający stres, co pozwala na lepsze jego dostosowanie do aktualnie panujących warunków środowiskowych. Adaptacja związana jest ze zmianami zachodzącymi w genomie osobnika w toku ewolucji, powstałymi na skutek zachodzących mutacji. Jest dziedziczna i prowadzi do różnicowania roślin pod względem morfologicznym i metabolicznym (Chavez i in., 2003; Wood, 2005).

1.2.2. Stres suszy

Działanie stresu wodnego leży u podłoża ewolucji roślin lądowych. Susza definiowana jest jako stan, w którym potencjał wody i turgor rośliny są na tyle obniżone, że ograniczają prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Skutki działania stresu wodnego uzależnione są od intensywności i czasu jego działania, jak również od stadium rozwojowego oraz uwarunkowań genetycznych rośliny (Plaut, 2003; Farooq i in., 2009). Na skutek niedoboru wody dochodzi do zmian zachodzących na różnych poziomach uorganizowania komórek, m.in. na poziomie morfologicznym i fizjologicznym. Zmiany na poziomie morfologii określane są jako SIMRs (ang. *Stress-Induced Morphogenesis Responses*) i dotyczą przede wszystkim zahamowania elongacji komórek, lokalnej stymulacji komórek i różnicowania komórek. Kluczowymi elementami regulującymi te zmiany są zależne od stresu stężenia reaktywnych form tlenu, antyoksydantów i roślinnych hormonów takich jak auksyny, czy etylen (Patakas, 2012). Niedobór wody prowadzi do redukcji potencjału wody, co związane jest z obniżeniem aktywności wody komórkowej, dehydratacją komórek i utratą turgoru. Następuje destabilizacja błony komórkowej, utrata jej integralności, selektywności, a także zakłócenie kompartmentów komórkowych i aktywności enzymów. Utrata turgoru wpływa na redukcję powierzchni liści, która skutkuje ich przedwczesnym starzeniem (Wahid i Rasul, 2005). Na skutek spadku potencjału wody w komórkach następuje sygnalizowany przez kwas abscysynowy (ABA, ang. *Abscisic Acid*) proces zamykania aparatów szparkowych, prowadzący do ograniczonej transpiracji i przepływu dwutlenku węgla (Tezara i in., 1999), co w konsekwencji skutkuje obniżeniem aktywności fotosyntetycznej. Zaburzenia sprawnie działającego aparatu fotosyntetyzującego przyczyniają się do generowania wolnych rodników, tworzących reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) (Reddy i in., 2004). Tym samym zaburzony zostaje balans pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu, a wydajnością sprawnie działającego układu antyoksydacyjnego, co prowadzi do akumulowania zwiększonych ilości ROS, indukujących stres oksydacyjny komórek oraz powodujących peroksydację białek, lipidów i kwasów nukleinowych (Fu i Huang, 2001). Czynnikiem silnie ograniczającym prawidłowy proces fotosyntezy jest także dezaktywacja kluczowych enzymów tego procesu (Bota i in., 2004). Na skutek odwodnienia komórek dochodzi do wzrostu stężenia soli i jonów, które wpływając na zwiększenie lepkości cytoplazmy, przyczyniają się do tworzenia niekorzystnych warunków dla prawidłowego

funkcjonowania enzymów. Dochodzić może do ich niespecyficznych oddziaływań, agregacji, czy nawet denaturacji (Hoekstra i in., 2001).

Zaburzenia powstające na poziomie subkomórkowym skutkują zahamowaniem procesów podziału i wzrostu komórek, tym samym przyczyniają się do redukcji wielkości uzyskiwanych plonów (Nonami, 1998). Wielkości spadku plonów na skutek deficytu wody raportowane dla wielu roślin zbożowych i zależne są zarówno od siły działania stresu oraz od stadium rozwojowego rośliny (Atteya i in., 2003; Monneveux i in., 2006; Lafitte i in., 2007). I tak w przypadku ryżu w okresie wypełniania nasion, łagodny stres suszy spowodował spadek wielkości plonu o 30-55%, natomiast drastyczny deficyt wody przyczynił się do redukcji plonów o ponad 60% (Basnayake i in., 2006). U jęczmienia, w fazie wypełniania ziarna, susza skutkowałą spadkiem plonu o 49-57% (Samarah, 2005).

1.2.2.1. Mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na stres suszy

W odpowiedzi na zmiany zachodzące na skutek działania stresu, rośliny wykształciły mechanizmy dostosowawcze, działające na poziomie morfologicznym, fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym, które pozwalają na minimalizowanie skutków stresu i utrzymanie stanu homeostazy (Amudha i Balasubramani, 2011). Wyróżnia się trzy główne strategie: ucieczki, unikania oraz tolerowania suszy. Mechanizm ucieczki polega na unikaniu czynnika zagrażającego poprzez wytworzenie barier, które zapobiegają jego przenikaniu do wnętrza rośliny. Bariereą taką może stanowić odpowiednie dostosowanie cyklu rozwojowego rośliny do sezonowych zmian warunków środowiskowych. Dostosowanie takie dotyczy głównie skrócenia okresu wegetacyjnego rośliny i zakończenia fazy reprodukcji jeszcze przed wystąpieniem dehydratacji komórek (Araus i in., 2002). Strategia ta realizowana jest głównie przez rośliny pustynne, charakteryzujące się szybkim wzrostem i krótkim okresem wegetacji. Natomiast u roślin zbożowych częstym zjawiskiem jest skrócenie okresu kwitnienia (Farooq i in., 2009). Strategia unikania obejmuje procesy zapobiegające utratę wody w komórce, które związane są z kontrolą transpiracji jak również mechanizmy maksymalizujące pobór wody do komórki, zależne od sprawności działania systemu korzeniowego (Kavar i in., 2007). Zapobieganie dehydratacji komórek związane jest z kontrolowanym procesem transpiracji i opiera się o mechanizmy zamykania aparatów szparkowych kontrolowane przez ABA, zmniejszania powierzchni liści poprzez zwijanie blaszek liściowych, ograniczenie ich rozmiarów lub

redukcję, jak również zwiększenia grubości warstw ochronnych liści, takich jak kutikula, czy kutner. Woskowy osad występujący na liściach pomaga w utrzymaniu wysokiego potencjału wody tkankowej i uznawany jest za cechę charakterystyczną odporności na stres suszy (Richards i in., 1986). Badania na liściach pszenicy wykazały, że te pokryte woskiem w porównaniu z nagimi, wykazały 0.7 °C niższą temperaturę i charakteryzowały się niższym stopniem starzenia (Richards i in., 1986). Mechanizmy zwiększające pobór wody do komórek zależą od cech systemu korzeniowego, zwłaszcza od jego masy, gęstości, czy długości i zdolności penetracji (Subbarao i in., 1995). Rozległy i głęboki system korzeniowy pozwala na wydobywanie wody z głębszych warstw gleby, co stanowi ważny parametr wpływający na efektywność działania mechanizmu obronnego, który w konsekwencji wpływa na wielkość uzyskiwanych plonów (Kavar i in., 2007). Trzecia strategia – tolerancji, dotyczy roślin, które zdolne są do tolerowania desykcji protoplastu i niwelowania negatywnych skutków stresu. Zjawisko tolerancji opiera się o zmiany zachodzące zarówno na poziomie fizjologicznym, biochemicznym jak i molekularnym (Reddy i in., 2004). Następuje uruchomienie fizjologicznych mechanizmów osmoregulacyjnych, jak również uaktywniony zostaje molekularny mechanizm odpowiedzi komórkowej, który związany jest z aktywacją szeregu genów indukowanych suszą (Shinozaki i in., 1999). Dochodzi do wzmożonej syntezy białek i metabolitów uczestniczących w procesach obronnych, jak również tych uczestniczących w regulacji ekspresji genów i ścieżek sygnałnych. Obok wzmożonej syntezy związków ochronnych, aktywacji ulegają hormony roślinne. Dochodzi do transkrypcji genów kodujących syntezę ABA, fitohormonu stanowiącego sygnał do aktywacji wielu ścieżek sygnałnych, stanowiącego m.in., główny czynnik regulujący transdukcję sygnału pomiędzy korzeniem a pędem rośliny (Leung i Giraudat, 1998; Finkelstein, 2002; Wilkinson i Davies, 2002). Wzrost jego poziomu reguluje mechanizm zamykania aparatów szparkowych, dzięki czemu kontroli podlega proces transpiracji. Badania na wielu gatunkach roślin wskazują, że w przypadku mutacji w genach kodujących enzymy z szlaku biosyntezy ABA, a tym samym przy obniżonej syntezie tego fitohormonu, dochodzi do wczesnego wędnięcia roślin i ich obumierania w warunkach deficytu wody (Koornneef i in., 1998; Liotenberg i in., 1999). Dostosowanie gospodarki osmotycznej roślin, pomaga w utrzymaniu równowagi wodnej w komórkach, a synteza i akumulowanie substancji rozpuszczonych w cytoplazmie minimalizuje uszkodzenia powstałe na skutek deficytu wody. Dzięki temu, możliwe jest prawidłowe funkcjonowanie organelli komórkowych, a tym samym aktywność fotosyntetyczna i wzrost rośliny (De Leonardis i in., 2012; Subbaro i in., 2000).



Ryc. 1.1. Mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na stres suszy (według De Leonardis i in., 2012).

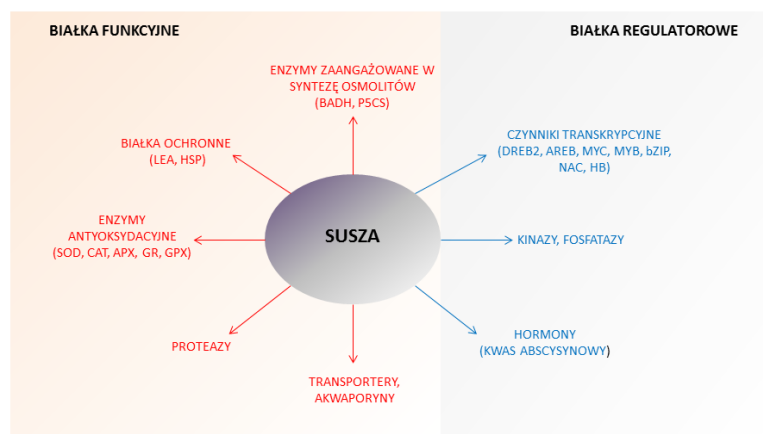
1.2.2.2. Odpowiedź roślin na stres suszy na poziomie ekspresji genów, białek i metabolitów

Na skutek działania stresu suszy dochodzi do zmian w poziomie ekspresji wielu genów. Ze względu na pełnione funkcje, geny reagujące na czynnik stresowy można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa, to geny wczesnie indukowane (ang. *Early Genes*), których wzrost poziomu ekspresji jest szybki, lecz często przejściowy. Do grupy tej zaliczane głównie geny kodujące białka regulatorowe, uczestniczące w regulacji ekspresji innych genów i modulacji ścieżek sygnałnych (Mahajan i Tuteja, 2005). Wśród nich znajdują się czynniki transkrypcyjne, kinazy, fosfatazy, enzymy metabolizmu fosfolipidów i inne białka związane z przekazywaniem sygnału, jak np. białka wiążące kalmodulinę (Shinozaki i Yamaguchi-Shimozaki, 2007). Przykładem są czynniki transkrypcyjne typu DREB (ang. *Dehydration Responsive Element Binding*), które regulują ekspresję wielu genów indukowanych suszą. Czynniki DREB oddziałują z elementami *cis* DRE/CRT (ang. *Dehydration Responsive Element/C-Repeat*), które obecne są w obrębie promotorów wielu genów odpowiadających na stres suszy. Ekspresja genów zawierających w promotorze sekwencję DRE (A/GCCGAC) uruchamiana jest pod wpływem stresu osmotycznego, jednakże nie jest zależna od ABA (Narusaka i in., 2003). Drugą ważną grupą białek regulujących ekspresję genów są czynniki transkrypcyjne wiążące sekwencję ABRE (ang. *ABA-Responsive Element*), których indukcja zależna jest od ABA. Geny te

zawierają w regionie promotorowym silnie konserwatywną sekwencję ABRE (PyACGTGG/TC), która rozpoznawana jest przez czynniki transkrypcyjne AREB/ABF (ang. *ABRE-Binding Protein*, *ABRE-Binding Factor*) (Huang i in., 2008). Gen *rd29a* jest jednym z genów indukowanych suszą, posiadających w swojej sekwencji promotorowej zarówno element DREB i ABRE, które funkcjonują w dwóch różnych systemach regulacji (Narusaka i in., 2003). Czynniki transkrypcyjne typu DREB czy ABRE zaangażowane są w regulację ekspresji genów późno indukowanych (ang. *Late Genes*). Geny te, ulegają ekspresji po godzinie od zadziałania czynnika stresowego, a następnie poziom akumulacji korespondujących cząsteczek mRNA utrzymywany jest na stałym poziomie. Zmiany w ekspresji genów późnych prowadzą do syntezy, akumulowania i zwiększonej aktywności specyficznych białek, chroniących komórki przed skutkami działania stresu (Mahajan i Tuteja, 2005). Do grupy tej zaliczane są między innymi geny odpowiadające na dehydratację (RD, ang. *Responsive to Dehydration*), na kwas abscysynowy (RAB, ang. *Responsive to Abscisic Acid*), czy na chłód (COR, ang. *Cold Responsive*), które kodują i modulują białka obronne (Mahajan i Tuteja, 2005). Białka będące produktami genów późnych zaangażowane są w mechanizmy obronne i naprawcze podczas działania czynnika stresowego. Są to białka uczestniczące w transporcie wody i jonów, białka zaangażowane w stabilizację struktur komórkowych oraz ich ochronę przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu, a także białka uczestniczące w syntezie związków osmotycznie czynnych. Do białek uczestniczących w transporcie wody i innych związków przez błony komórkowe należą akwaporyny. Te integralne białka błonowe zapewniają utrzymanie wysokiego potencjału wody w komórce w trakcie warunków suszy, a także odgrywają ważną rolę podczas rehydratacji po ustaniu stresu (Farooq i in. 2009). Białka szoku cieplnego (HSP, ang. *Heat Shock Protein*) to rodzina białek, które zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w stresie odpowiedzialne są za utrzymanie stanu homeostazy komórkowej. Ich opiekuńcze działanie związane jest z kontrolą procesu fałdowania i oligomeryzacji polipeptydów, zapobieganiem agregacji, czy degradacją nieodwracanie uszkodzonych białek (Timperio i in., 2008; Al-Whabi, 2011). Kolejna grupa białek to białka późnej embriogenezy, które nagromadzane są w późnej fazie rozwoju zarodka, ale akumulowane są także w organach wegetatywnych w warunkach stresu suszy. Ich funkcja obronna związana jest ze stabilizacją i utrzymaniem integralności błon komórkowych i innych struktur komórkowych, zapobieganiem agregacji białek, czy pełnieniem roli w ochronie antyoksydacyjnej (Kovacs, 2008).

W usuwanie nadmiernych ilości wolnych rodników, generowanych podczas stresu oksydacyjnego, zaangażowane są dwa mechanizmy: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Nieenzymatyczny to obecność w komórkach związków takich jak: tokoferole, kwas askorbinowy czy glutation. Natomiast mechanizm enzymatyczny związany jest z obecnością szeregu enzymów zaangażowanych w procesy zmiatania wolnych rodników. Do enzymów tych należą: dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazy askorbinianowe, katalazy, peroksydazy glutationowe, czy peroksyredoksyny (Reddy i in., 2004). Stres osmotyczny skutkuje wieloma niekorzystnymi zmianami zachodzącymi w roślinie. Na skutek jego działania dochodzi do zwiększenia w komórce stężenia związków kompatybilnych (osmolitów, osmoprotektantów), a mechanizm ten określany jest jako dostosowanie osmotyczne. Nagromadzenie w komórkach osmolitów, związane jest z zwiększoną syntezą enzymów, które uczestniczą w kluczowych etapach szlaków ich syntezy. Jednym z osmolitów syntetyzowanych w warunkach dehydratacji komórek jest betaina glicynowa (GB, ang. *Glycine Betaine*), a kluczowym enzymem katalizującym reakcję utlenienia aldehydu betainowego do betainy glicynowej jest dehydrogenaza aldehydu betainowego (BADH, ang. *Betaine Aldehyde Dehydrogenase*) (Hanson i in., 1985; Chen i Murata, 2002, 2011). Betaina glicynowa zaangażowana jest w osmoregulację, ponadto stabilizuje struktury błon komórkowych i białek oraz chroni aparat fotosyntetyczny (Genard i in., 1991, Giri, 2011). Drugim ważnym osmoprotektantem, syntetyzowanym w odpowiedzi na deficyt wody jest prolina. Prekursorem do syntezy proliny jest kwas glutaminowy, a kluczowym enzymem zaangażowanym w ten proces jest syntetaza delta-1-pirolidyno-5-karboksylationu (P5CS, ang. *Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase*) (Hu i in., 1992; Delauney i Verma, 1993). Funkcje obronne proliny związane są z działaniem aminokwasu jako zmiatacza wolnych rodników, czaperonu stabilizującego struktury komórkowe, czy regulatora potencjału osmotycznego (Verbruggen i Hermans, 2008; Szabados i Savoure, 2010). Inną grupą metabolitów pełniących funkcje osmoprotektantów są poliaminy, wśród których najpowszechniej występują: spermidyna (triamina), spermina (tetramina) i putrescyna (diamina). Poliaminom przypisuje się funkcje, które związane są ze stabilizacją i ochroną błon biologicznych i kwasów nukleinowych, a także ze zmiataniem wolnych rodników. Ponadto zaangażowane są w programowaną śmierć komórek oraz pełnią funkcję cząsteczek sygnałnych w warunkach stresu (Kaur-Sawhney in., 2003; Gill i Tuteja, 2010). W warunkach deficytu wody dochodzi do zmian w poziomie akumulacji węglowodanów i ich pochodnych. Należą do nich monosacharydy, disacharydy, oligosacharydy, alkohole polihydroksylowe. Na skutek działania stresu suszy następuje

uwalnianie cukrów prostych ze zgromadzonych wcześniej zapasów skrobi, czy fruktanów. Akumulowane rozpuszczalne cukry działają stabilizująco na błony komórkowe i białka, a także pomagają roślinie w utrzymaniu turgoru (Sicher i in., 2012). Wyniki badań wskazują, że mogą one dodatkowo pełnić funkcje cząsteczek sygnałnych (Hanson i Smeekens, 2009).



Ryc.1.2. Produkty genów indukowanych stresem suszy. Białka sklasyfikowano na dwie grupy: białka funkcyjne, związane z odpornością roślin i białka regulatorowe, uczestniczące w regulacji ekspresji genów i ścieżek sygnałnych (według Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

1.3. Proteomika roślinna

Termin „proteom” po raz pierwszy użyty został przez Marca Wilkinsa w 1994 roku i zdefiniowany został jako komplet białek obecnych w komórkach, tkankach, czy organizmie, kodowanych przez genom, w określonych warunkach zewnętrznych i wewnętrznych oraz w określonym punkcie czasowym i rozwojowym organizmu (Wilkins i in., 1996). W roku 1997 analogicznie do pojęcia „genomika” wprowadzono termin „proteomika”. Proteomika jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki, zajmującą się globalną analizą składu białkowego komórki, tkanki, czy całego organizmu. Celem proteomiki jest badanie proteomu, który, mimo iż determinowany jest przez statyczny genom, jest niezwykle dynamiczny i zmienny w zależności od stanu rozwojowego organizmu, czy warunków środowiskowych (Thelen, 2007; Liebler, 2002; Barbier-Brygoo

i Joyard, 2004). Proteomika definiowana jest również jako dyscyplina, której nadrzędnym celem jest identyfikacja białek oraz poznanie zachodzących pomiędzy nimi interakcji. Ponadto pozwala na śledzenie aktywności białek w określonych stadiach wzrostu i rozwoju organizmu oraz poznanie roli jaką pełnią w oddziaływaniu z środowiskiem zewnętrznym.

Pierwsze pionierskie prace dotyczące podstawowych technik wykorzystywanych w badaniach proteomicznych datowane są na lata 1975 ubiegłego wieku (O'Farrell, 1975). W latach 80 przeprowadzone zostały badania dotyczących zmian w obrębie proteomu roślinnego pod wpływem działania czynników środowiskowych. Hurkman i Tanaka (1987) przeprowadzili ocenę zmian poziomu białek jęczmienia pod wpływem działania stresu solnego. Pomimo, że większość białek nie została wówczas zidentyfikowana, zbadano wpływ stresu na syntezę białek *de novo* i określano zmiany zachodzące w poszczególnych frakcjach komórkowych (Hurkman i Tanaka, 1987). Kilka lat później utworzono pierwszą listę białek zaangażowanych w odpowiedź roślin na czynniki stresowe (Costa i in., 1998).

Przełomowym dla proteomiki roślinnej okazało się wykorzystanie technik spektrometrii mas do identyfikacji białek. Pierwsze badania przeprowadzone zostały na korzeniach kukurydzy, w których analizowano zmiany profili białek w warunkach ograniczonego dostępu tlenu (Chang i in., 2000). Ponadto rozwój technik sekwencjonowania DNA we wczesnych latach 90 oraz rosnąca liczba zsekwencjonowanych genomów przyczyniły się do tego, iż proteomika stała się niezbędnym narzędziem wykorzystywanym zarówno w biologii molekularnej jak i w biologii systemów (Patterson i Aebersold, 2003).

W zależności od stawianego celu badawczego, proteomikę można podzielić na kilka obszarów: proteomikę opisową, porównawczą, modyfikacji potranslacyjnych, funkcjonalną, czy proteomikę oddziaływań. Proteomika, obok genomiki, transkryptomiki i metabolomiki odgrywa istotną rolę w badaniach z zakresu biologii systemów. Ponieważ białka stanowią główne nośniki aktywności biologicznej komórek, ich identyfikacja oraz poznanie zmian jakim podlegają pod wpływem określonych czynników środowiskowych jest niezwykle ważne dla poznania podłoża i przebiegu zachodzących procesów molekularnych. Dane proteomiczne w połączeniu z informacjami uzyskanymi na poziomie genomu (DNA), transkryptomu (RNA), metabolomu (metabolity) oraz z charakterystyką fenotypową i fizjologiczną dają możliwość lepszego poznania wzajemnych zależności, zachodzących na różnych poziomach molekularnych organizmów żywych (Van Wijk, 2001; Bolewell i in., 2004).

1.3.1. Podejście metodyczne stosowane w badaniach proteomów roślinnych

Ze względu na dużą ilość białek w organizmach żywych, ich złożoność, zmienność, obecność modyfikacji potranslacyjnych oraz wysoce zróżnicowane właściwości fizykochemiczne, istnieje konieczność doboru odpowiedniej metodyki oraz strategii analitycznej przed przystąpieniem do właściwego eksperymentu (Barbier-Brygoo i Joyard, 2004). Właściwe przygotowanie próbki do badań związane jest z uzyskaniem jednorodnego oraz stabilnego materiału, pozbawionego wszelkich zanieczyszczeń oraz substancji niepożądanych. Niezwykle istotny wpływ na uzyskanie powtarzalnych wyników analiz jakościowych i ilościowych, ma przestrzeganie tych samych warunków hodowli, sposób pobierania materiału, jego przechowywania oraz metodyka izolacji, separacji i detekcji białek. W każdym z etapów składających się na proces przygotowania materiału do badań istnieje ryzyko zmian składu bądź struktury proteomu, które uzasadnione jest dynamiką procesów metabolicznych zachodzących w komórce. Dla zachowania stabilności struktur komórkowych oraz zatrzymania aktywności enzymatycznej konieczny jest odpowiedni sposób oraz czas przechowywania materiału roślinnego. Tkanki roślinne zawierają cały wachlarz białek różniących się masami cząsteczkowymi, właściwościami fizykochemicznymi, czy rozpuszczalnością, które wymagają odpowiednich warunków procesu ekstrakcji oraz oczyszczania. Obecność ściany komórkowej, związków będących produktami metabolizmu wtórnego oraz licznych proteaz może w znaczący sposób zakłócać proces ekstrakcji białek, co związane jest z utrudnioną interpretacją uzyskiwanych wyników (Wang i in., 2008; Shewry i Fido, 1996).

Proteomika roślinna może dotyczyć analizy całej populacji białek komórki, tkanki, czy organizmu, jak również konkretnych subpopulacji białek pochodzących z określonych frakcji komórkowych. Możliwość wyodrębnienia białek przedziałów komórkowych, czy poszczególnych organelli może znacznie zwiększyć szansę identyfikacji białek oraz ułatwić interpretację wyników badań. Frakcjonowanie struktur komórkowych umożliwia oddzielenie określonych organelli na podstawie różnic we właściwościach chemicznych, fizycznych, czy biologicznych. W tym celu stosowane są najczęściej określone techniki wirowania, skutkujące oddzieleniem frakcji komórkowych w zależności od ich ciężaru i gęstości. Dalsze etapy izolacji białek zarówno całych proteomów jak i subproteomów opierają się o określone techniki ekstrakcji, wytrącania i oczyszczania (Hurkman i Tanaka, 2007).

Powszechnie stosowaną procedurą izolacji białek jest zastosowanie kwasu trójchlorooctowego w połączeniu z acetonem. Inną stosowaną metodą jest fenoliza wykorzystująca wodny roztwór fenolu w połączeniu z octanem amonu rozpuszczonym w metanolu. Obie stosowane metody są szybkie, eliminują proteazy oraz inne klasy związków niepożądanych, zapobiegając w ten sposób interferencji związków, mogących zaburzać proces rozdziału białek. Metoda z zastosowaniem fenolu częściej wykorzystywana jest w przypadku próbek, zawierających duże ilości frakcji membranowych. Wykazała też zwiększoną wydajność w przypadku izolacji białek glikozylowanych (Thelen, 2007).

Wybór metody separacji i identyfikacji białek uzależniony jest głównie od struktury oraz stopnia złożoności próbki. Jedną z najczęściej wykorzystywanych strategii jest połączenie dwukierunkowych rozdzielaczy elektroforetycznych z identyfikacją białek w spektrometrze masowym typu MALDI-TOF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight*) lub tandemowym spektrometrze ESI-MS/MS (ang. *Electrospray Tandem Mass Spectrometry*) (Görg i in., 2004).

1.3.2. Elektroforeza dwukierunkowa

Podstawowym narzędziem wykorzystywanym do separacji białek w proteomice jest dwukierunkowa elektroforeza w żelach poliakrylamidowych. Pierwsze dwukierunkowe rozdzielacze elektroforetyczne datowane są na rok 1975, kiedy to O'Farrell przeprowadził ogniskowanie izoelektryczne białek *Escherichia coli* (O'Farrell, 1975). Ważnym momentem dla rozwoju tej techniki było wprowadzenie żelowych pasków z unieruchomionym gradientem pH, które w znaczący sposób poprawiły powtarzalność uzyskiwanych wyników. Jednakże przełomem był rozwój technik spektrometrii mas, który pozwolił na skuteczną i szybką identyfikację białek. Od tej pory metody oparte o przeciwciała, czy porównywanie migracji białek ze znanymi białkami na obrazach elektroforetycznych zostały zastąpione poprzez techniki spektrometryczne, umożliwiające poznanie mas peptydów, a następnie ich porównanie z sekwencjami genowymi określonych organizmów w bazach danych.

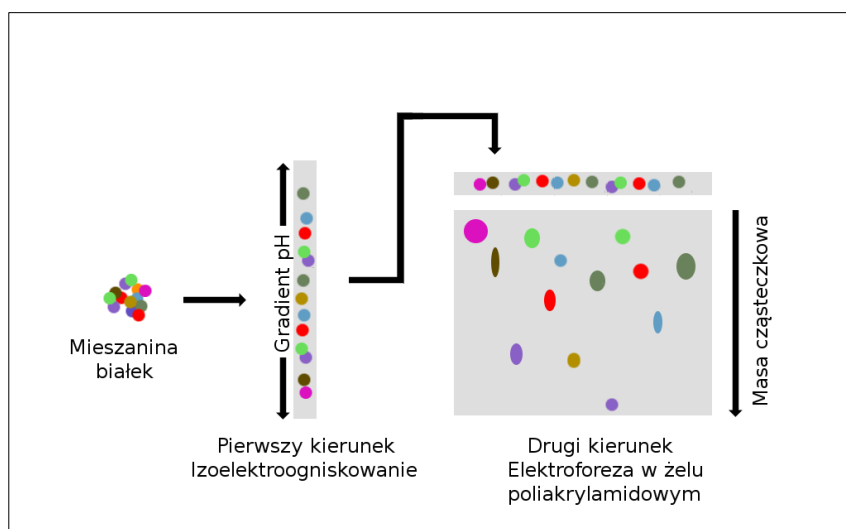
Elektroforeza dwukierunkowa białek w żelu poliakrylamidowym składa się z dwóch etapów rozdzielania. Pierwszy, to ogniskowanie izoelektryczne (IEF, ang. *Isoelectro Focusing*), w którym białka pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego migrują w

gradientie pH, tworzonym przez mieszaninę amfolitów i rozdzielane są na podstawie posiadanego punktu izoelektrycznego (pI, ang. *Isoelectric Point*), odpowiadającego takiej wartości pH, w której wypadkowy ładunek białka jest równy 0. W drugim kierunku (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), białka rozdzielane są w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, w obecności dodecylosiarczanu sodu, ze względu na posiadaną masę cząsteczkową. Przed przystąpieniem do rozdziału mieszaniny białek, konieczne jest właściwe przygotowanie próbki. W tym celu w buforach stosowane są związki chaotropowe, które destabilizując wiązania niekowalencyjne i jonowe pomiędzy resztami aminokwasowymi, ułatwiają rozdział białek w gradientie tworzonym przez amfolity o określonym zakresie pH. Przed separacją białek w drugim wymiarze konieczne jest przeprowadzenie dwóch reakcji – redukcji i alkilacji. Redukcja, prowadzona z zastosowaniem czynników redukujących, m.in. ditiotreitolu prowadzi do redukowania mostków disiarczkowych, występujących pomiędzy resztami cysteiny sąsiadujących aminokwasów, co prowadzi do niszczenia struktury przestrzennej białka. Reakcja alkilacji, przeprowadzana z użyciem jodoacetamidu, poprzez blokowanie grup tiolowych, zapobiega ponownemu odtwarzaniu się mostków disiarczkowych (Smith, 2009). Po zakończonym etapie rozdziału, białka poddawane są utrwaleniu, a następnie wybarwieniu. Proces wybarwiania białek może odbywać się w różnych etapach analizy: przed ogniskowaniem izoelektrycznym, pomiędzy dwoma rozdzielaniami, a także najczęściej stosowany - po zakończeniu dwóch etapów. Proces barwienia odbywa się przy użyciu organicznych barwników, wiążących się na zasadzie oddziaływań niekowalencyjnych. Do najczęściej stosowanych barwników należy błękit Coomassie (CBB, ang. *Coomassie Brilliant Blue*), charakteryzujący się dużym powinowactwem do białek, jednakże niskim poziomem detekcji. Znaczne zwiększenie czułości i powtarzalności detekcji uzyskuje się poprzez zastosowanie Coomassie w wersji koloidalnej (limit detekcji ~100 ng). Barwienie srebrem zapewnia o wiele wyższą czułość detekcji (~1ng), jednakże jest to metoda najbardziej złożona, mniej powtarzalna i niekompatybilna z technikami spektrometrii mas. Bardzo wysoką czułość (~2-10ng) zapewniają barwniki fluorescencyjne, jednakże są drogie oraz wymagają odrębnego sprzętu do wizualizacji rozdzielonych białek (Steinberg, 2009).

Wybarwione elektroforegramy w kolejnym kroku poddawane są analizie komputerowej, w celu określenia zmian profili akumulacji poszczególnych białek pomiędzy danymi próbkami, która polega na porównywaniu zmian w powierzchni i intensywności uwidocznionych plamek białkowych. Przykładem tego typu programu jest

Image Master Platinum 2D. W pierwszym etapie analizy elektroforegramów następuje detekcja plamek białkowych. W celu zwiększenia poprawności dopasowania plamek (*ang. Spot Matching*), a tym samym wykluczenia plamek będących artefaktami wynikającymi z błędów technicznych podczas rozdziału białek, nanoszone są punkty orientacyjne (*ang. Landmark*), reprezentujące te same białka na wszystkich analizowanych żelach. Dzięki temu etap dopasowywania plamek jest dokładniejszy, jednakże nie można wykluczyć błędnych połączeń plamek.

Ze względu na wysoką czułość oraz dużą rozdzielczość analiz, elektroforeza dwukierunkowa jest powszechnie stosowaną techniką separacji białek. Pozwala na uwidocznienie od 1000 do 5000 białek, z możliwością detekcji 1 ng materiału z pojedynczej próbki. Ponadto charakteryzuje się możliwością rozdziału białek o szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Zaletą metody jest także możliwość uzyskania informacji dotyczących masy cząsteczkowej i punktu izoelektrycznego białka, a także łatwość łączenia z innymi technikami np. z elektrotransferem. Dużym ograniczeniem metody mogą być różnice w rozdziale oraz przesunięcia pozycji poszczególnych białek, będące często efektem błędów przy polimeryzowaniu żelu, czy różnic w natężeniu pola elektrycznego. Problemem jest także niejednoznaczność identyfikacji wynikająca z nałożenia się kilku białek w postaci jednej plamki białkowej. Wadą metody jest także trudność w rozdziale białek o małych i bardzo dużych masach cząsteczkowych. Stosunkowo niski poziom detekcji stosowanych technik wybarwienia może sprawić, że podczas analizy pominięte zostaną subtelne różnice w profilach akumulacji badanych białek (Gorg i in., 2004; Lilley i in., 2002).



Ryc. 1.3. Schemat rozdziału mieszaniny białek metodą elektroforezy dwukierunkowej (według Sikorska i Rodziewicz, 2011)

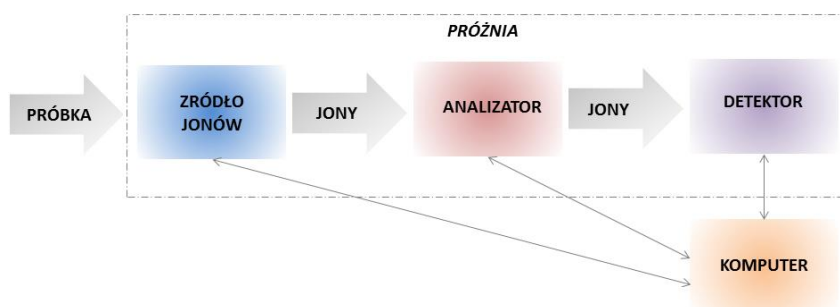
1.3.3. Spektrometria mas jako narzędzie analityczne wykorzystywane w proteomice

Przez długi czas identyfikacja białek opierała się o analizę aminokwasów, immunodetekcję, czy metodę degradacji Edmanna (Towbin i in., 1979; Vandekerchove i in., 1985; Eckerskorn i in., 1988). Przełomowymi dla identyfikacji białek były lata 80 XX wieku, kiedy nastąpił gwałtowny rozwój technik miękkiej jonizacji w spektrometrii mas. Poprzez wprowadzenie jonizacji przez desorpcję laserem z matrycy (MALDI, ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) oraz jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI, ang. *Electrospray Ionization*) spektrometria mas stała się podstawową metodą badawczą wykorzystywaną do identyfikacji białek (Karas i Hillenkamp, 1988; Fenn i in., 1989). Spektrometria mas pozwala na określenia masy cząsteczkowej oraz składu elementarnego analizowanej substancji, na podstawie stosunku masy (m) do ładunku elektrycznego (z), powstających w źródle jonów molekularnych (M^+) lub protonowanych bądź deprotonowanych cząsteczek ($[M+H]^+/[M-H]^-$). Spektrometr masowy składa się z komory jonizacyjnej, analizatora, który mierzy stosunek masy do ładunku powstałych jonów i detektora, rejestrującego liczbę jonów o określonej wartości m/z . Ogólny schemat budowy spektrometru mas przedstawiono na rycinie 1.4.

Technika MALDI wykazuje szeroki zakres zastosowań w proteomice, gdzie wykorzystywana jest do analizy białek, peptydów, czy oznaczania miejsc modyfikacji potranslacyjnych, takich jak na przykład glikozylacji, czy fosforylacji. W metodzie tej próbka poddawana analizie, krystalizowana jest z drobnocząsteczkowym związkem, określanym mianem matrycy, który absorbując wiązki promieniowania lasera ulega jonizacji, tym samym jonizując cząstki badanego związku. Dobór odpowiedniej matrycy, zależy od rodzaju badanego związku, jego masy cząsteczkowej, rodzaju analizy, czy stosowanego lasera. Najczęściej stosowanymi matrycami są: kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy, kwas synapinowy, kwas ferulowy, czy kwas gentyzynowy. Najczęściej wykorzystuje się lasery działające w ultrafiolecie, np. azotowy (337nm) (O'Connor i Hillenkamp, 2007).

Kluczowymi parametrami analizatorów stosowanych w spektrometrach masowych są czułość, rozdzielczość i dokładność mierzonych mas. Do najpowszechniej wykorzystywanych analizatorów w badaniach proteomicznych należą: pułapka jonowa (IT, ang. *Ion Trap*), analizator czasu przelotu (TOF, ang. *Time of Flight*), kwadrupol (Q, ang. *Quadrupole*) oraz analizator cyklotronowego rezonansu jonowego z fourierowską

transformacją wyników (FT-ICR, ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Ze względu na impulsowy charakter źródła jonów MALDI oraz pracę w warunkach wysokiej próżni, najczęściej wykorzystywany jest analizator typu TOF. Mechanizm jego działania opiera się na fakcie, że wszystkie jony o tej samej krotności ładunku, które ulegają przyspieszeniu w polu elektrycznym, posiadają taką samą energię kinetyczną. W związku z tym prędkość jonu jest wprost proporcjonalna do jego masy. Jony o małej masie docierają do detektora znacznie szybciej, podczas gdy jony cięższe poruszają się wolniej. Mierząc czas przelotu jonów można określić stosunek ich masy do ładunku (m/z) (Knochenmuss i in., 2010). W celu zwiększenia rozdzielczości analiz, spektrometry MALDI mogą być wyposażone w dwa analizatory typu TOF-TOF. Zastosowanie takiego sprzężenia pozwala na przeprowadzenie fragmentacji poszczególnych jonów macierzystych oraz na sekwencjonowanie peptydów *de novo* (O'Connor i Hillenkamp, 2007).



Ryc. 1.4. Poglądowy schemat budowy spektrometru mas (według Staszaków i Swarcewicz, 2011).

1.3.3.1. Identyfikacja białek metodami spektrometrii mas

Analiza białek z zastosowaniem technik spektrometrii mas przeprowadzana jest za pomocą trzech głównych podejść: „bottom-up”, „shotgun” i „top-down”. Strategia „bottom-up” polega na poznaniu stosunku masy do ładunku (m/z) peptydów, uzyskanych w wyniku enzymatycznego trawienia białka, a następnie identyfikacji tego białka. Pierwszym wymaganym etapem jest rozdział mieszaniny białek, w którym najczęściej wykorzystywane są dwukierunkowe rozdziały elektroforetyczne w żelach

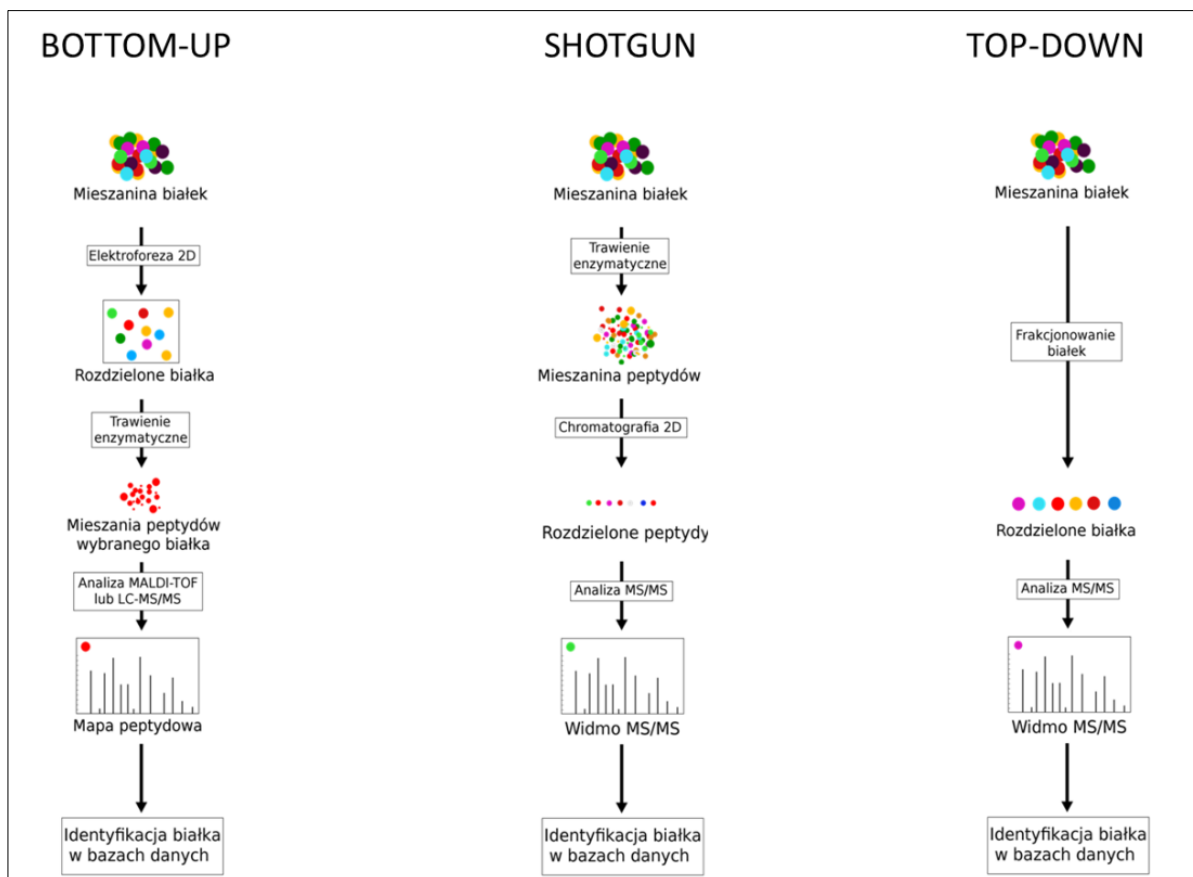
poliakrylamidowych. Rozdzielone białka są następnie wycinane z żelu, oczyszczane oraz poddawane reakcji redukcji i alkilacji, w celu zerwania mostków disiarczkowych oraz zapobiegania ponownego sieciowania się peptydów. Tak przygotowane próby poddawane są trawieniu enzymatycznemu. Najczęściej używanym do tego celu enzymem jest trypsyna, hydrolizująca wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego w miejscach występowania argininy i lizyny, jeżeli nie poprzedza jej prolina. Inną stosowaną endoproteinazą jest chymotrypsyna, która rozcina łańcuchy peptydowe po wystąpieniu hydrofobowych aminokwasów takich jak tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina, leucyna czy metionina (Matthiesen i Mutenda, 2007). Peptydy, uzyskane w wyniku enzymatycznego trawienia pojedynczego białka, analizowane są metodami spektrometrii mas, a najczęściej wykorzystywanym instrumentem jest spektrometr masowy typu MALDI-TOF. Metoda odcisku palca mapy peptydowej (PMF, ang. *Peptide Mass Fingerprinting*) jest najpowszechniej stosowaną metodą identyfikacji białek i zakłada, że wygenerowane, unikatowe zestawy peptydów uzyskanych w wyniku enzymatycznego trawienia określonego białka stanowią podstawę do jego identyfikacji. Otrzymane widmo masowe, w postaci mapy peptydowej wykorzystywane jest do przeszukiwania baz danych i porównywania mas peptydów zmierzonych przez spektrometr z masami map peptydowych uzyskanych w wyniku teoretycznego trawienia tym samym enzymem wszystkich dostępnych sekwencji białkowych, obecnych w bazach danych (Hjernø, 2007; Sommerer, 2007). Algorytmy za pomocą, których przeszukiwane są bazy danych biorą pod uwagę takie parametry jak: wielkość i rodzaj bazy danych, taksonomię, spodziewane modyfikacje białek, zakres tolerancji mas peptydów oraz stosowany enzym proteolityczny (Scheler i in., 1998). Przeszukiwanie baz danych opiera się o sekwencje nukleotydowe badanego organizmu. W przypadku, gdy badany gatunek nie posiada zsekwencjonowanego genomu, identyfikacja białek przeprowadzana jest na podstawie homologii z innymi spokrewnionymi gatunkami. Zaletą metody PMF jest krótki czas analizy, wynik identyfikacji można uzyskać w przeciągu kilku minut. Ponadto do analizy wymagana jest niewielka ilość próbki, istnieje także możliwość jej przechowywania po analizie. Dużym ograniczeniem metody jest natomiast brak identyfikacji lub nieprawidłowa identyfikacja, które mogą wynikać z np. słabej jonizacji niektórych peptydów, czy z obecności zanieczyszczeń. W przypadku analizy fragmentu żelu zawierającego więcej niż jedno białko może dochodzić do pojawienia się dodatkowych sygnałów na widmie, co skutkuje niejednoznacznością identyfikacją białka. W strategii „bottom-up” możliwe jest także wykorzystanie tandemowego spektrometru masowego, umożliwiającego fragmentację

poszczególnych peptydów, a uzyskane widma MS/MS pozwalają na uzyskanie częściowej sekwencji białka. Przykładem może być spektrometr MALDI wyposażony w dwa analizatory typu TOF (TOF/TOF), lub spektrometr ze źródłem jonów typu ESI wyposażony w dwa analizatory i sprzężony z chromatografią cieczową (LC-MS/MS).

Pewnego rodzaju modyfikacją metodyki „*bottom-up*” jest strategia „*shotgun*”, określana również jako wielowymiarowa metoda identyfikacji białek (MudPIT, ang. *Multidimensional Protein Identification Technology*). Możliwość identyfikacji nawet kilku tysięcy białek podczas jednej analizy sprawia, że metoda ta cieszy się coraz większą popularnością w badaniach proteomicznych. W tym podejściu pomijane są czasochłonne rozdziały elektroforetyczne białek, a mieszanina białek poddawana jest bezpośredniemu trawieniu enzymatycznemu. W wyniku proteolizy białek uzyskiwana jest bardzo złożona mieszanina peptydów, która następnie poddawana jest frakcjonowaniu metodami chromatograficznymi. W analizach tak skomplikowanych i złożonych mieszanin wykorzystanie jednego rodzaju mechanizmu separacji jest często niewystarczające. Dlatego konieczne jest zastosowanie przynajmniej dwóch wymiarów rozdziały chromatograficznego, w których do rozdziały wykorzystywane są różne właściwości fizykochemiczne białek. Przykładem może być m.in. sączenie molekularne, chromatografia jonowymienna, oddziaływań hydrofobowych, czy powinowactwa. Jednak najczęściej stosowaną techniką chromatografii wielowymiarowej jest dwuwymiarowa chromatografia cieczowa (2D-LC, ang. *Two-dimensional Liquid Chromatography*), wyposażona w kolumnę jonowymienną, rozdzielającą peptydy względem ich ładunku – rozdziały w pierwszym kierunku oraz kolumnę ze złożem odwróconym (RP-18, RP-8, RP-4), rozdzielająca peptydy względem ich hydrofobowości i oddziaływanie ze złożem – rozdziały w drugim kierunku (Yates i in., 2009). W strategii „*shotgun*” konieczne jest wykorzystanie tandemowego spektrometru masowego, umożliwiającego przeprowadzenie selekcji określonych peptydów, a następnie ich fragmentacji. W komorze kolizyjnej zjonizowany peptyd ulega indukowanej dysocjacji (CID, ang. *Collision Induced Dissociation*), a w wyniku zderzeń z cząsteczkami gazu szlachetnego następuje rozerwanie szkieletów węglowych peptydów. Powstające jony fragmentacyjne tworzą widmo MS/MS, z którego możliwe jest odczytanie sekwencji peptydu (Kelleher i in., 1999). Fragmentacja może również zachodzić z wykorzystaniem innych technik: poprzez rozpad z wychwytem elektronów (ECD, ang. *Electron Capture Dissociation*) lub rozpad z przeniesieniem elektronów (ETD, ang. *Electron Transfer Dissociation*), jednakże te metody umożliwiają fragmentację większych peptydów oraz określenie ich modyfikacji potranslacyjnych

(Creese i Cooper, 2007; Syka i in., 2004). Niewątpliwą zaletą metody „shotgun” jest możliwość jednoczesnej analizy złożonych mieszanin białkowych, ponadto powszechnie stosowana jest do badania miejsc i rodzaju modyfikacji potranslacyjnych. Możliwość stosowania podczas analizy znaczników izobarycznych iTRAQ (ang. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*), znaczników ICAT (ang. *Isotope-Coded Affinity Tag*), czy SILAC (ang. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture*) pozwala na wykorzystanie metody w proteomice porównawczej. Znaczącym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości identyfikacji różnych izoform białek (Sommerer, 2007).

Trzecią strategią wykorzystywaną w proteomice jest podejście „top-down”, eliminujące etap trawienia enzymatycznego białek. Analiza polega na fragmentacji całych białek w spektrometrze masowym, a uzyskane widmo masowe białka oraz jego fragmentów pozwala na ustalenie sekwencji aminokwasowej, a także precyzyjne określenie miejsc i rodzaju modyfikacji potranslacyjnych. W tym podejściu wykorzystywane są spektrometry masowe, charakteryzujące się bardzo wysoką dokładnością pomiaru, czułością oraz rozdzielczością. Najczęściej wykorzystywanym instrumentem jest spektrometr masowy z analizatorem cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (FT-ICR), a także spektrometr z hybrydowym analizatorem pułapka jonowa – Orbitrap® (LTQ-Orbitrap). W przypadku analizy złożonej mieszaniny białek, konieczne jest przeprowadzenie procesu frakcjonowania. W tym celu wykorzystywane są metody chromatograficzne: chromatografia cieczowa, chromatografia cieczowa z odwróconą fazą, oddziaływań hydrofobowych, elektroforeza. Zaletą metody „top-down” jest możliwość uzyskania 100% pokrycia sekwencji badanego białka, a także możliwość analizy miejsc i rodzaju modyfikacji potranslacyjnych. Jednakże technika ta wymaga dużej ilości oczyszczonego białka do analizy oraz ogranicza się do białek o masach cząsteczkowych nieprzekraczających 30 kDa. Dużym ograniczeniem jest także trudna interpretacja złożonych widm fragmentacyjnych (Catherman i in., 2014).



Ryc. 1.5. Porównanie trzech strategii identyfikacji białek (według Sikorska i Rodziejewicz, 2011).

1.3.3.2. Interpretacja wyników i bazy danych

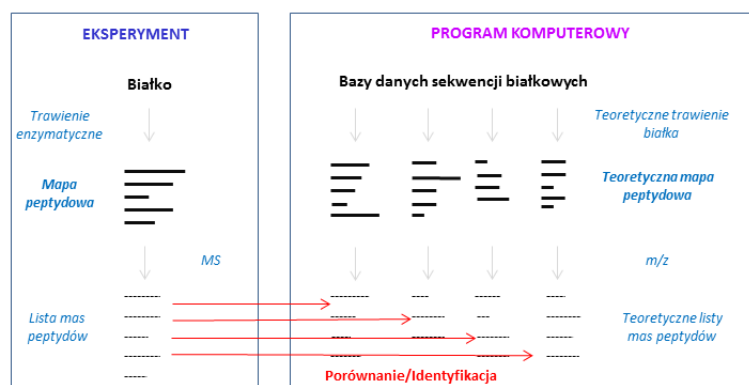
Kompleksowa analiza danych uzyskiwanych podczas analiz proteomicznych opiera się na narzędziach bioinformatycznych, na które składają się algorytmy i oprogramowania wykorzystujące dane uzyskane w spektrometrze masowym. Metoda odcisku palca mapy peptydowej (PMF, ang. *Peptide Mass Fingerprinting*), jest najpowszechniej stosowaną metodą identyfikacji białek uzyskiwaną na instrumencie MALDI-TOF (Thiede i in., 2005; Henzel i Watanabe, 2003). Uzyskiwane widmo masowe w postaci mapy peptydowej wykorzystywane jest do przeszukiwania baz danych i porównywania mas peptydów zmierzonych przez spektrometr z masami map uzyskanych *in silico* w bazach danych (Hjernø, 2007; Sommerer, 2007).

Do najpopularniejszych programów umożliwiających przeszukiwanie baz danych należą SEQUEST, ProteinProspector oraz MASCOT. Algorytmy za pomocą których przeszukiwane są bazy danych biorą pod uwagę takie parametry jak wielkość i rodzaj bazy danych, przewidywane modyfikacje białek, zakres tolerancji mas peptydów, stosowany enzym do trawienia, czy taksonomię (Scheler i in., 1998). Początkowo identyfikacja opierała się na ilości trafień pomiędzy masami zmierzonych peptydów, a masami peptydów obecnych w bazie danych. Ten sposób przeszukiwania działał dobrze dla danych eksperymentalnych o wysokiej jakości, jednakże wadą było przypadkowe dopasowywanie do map peptydowych dużych białek, co związane było z uzyskiwaniem danych fałszywie prawdziwych. Zastosowanie algorytmu MOWSE (ang. *MOlecular Weight SEarch*) wyeliminowało te wady, gdyż pod uwagę brany jest fakt, że względna intensywność jonów poszczególnych peptydów, o określonej długości zależy nie tylko od masy peptydu, ale i od masy całego białka, dzięki czemu przypadkowa identyfikacja występuje z znacznie niższą częstotliwością. Poprawna identyfikacja białka opiera się o następujące parametry: ilość przyznanych punktów przez algorytm MOWSE, wartość p (p -value), procent dopasowania sekwencji aminokwasowej białka, oraz różnica mas pomiędzy peptydami zmierzonymi eksperymentalnie i teoretycznymi. Dodatkowo uwzględniana jest teoretyczna masa cząsteczkowa oraz punkt izoelektryczny białka, które powinny być zgodne z danymi eksperymentalnymi (Sommerer, 2007; Henzel i Watanabe, 2003).

W przypadku widm fragmentacyjnych, zawierających informację o sekwencji aminokwasowej białka, możliwe jest zastosowanie dwóch podejść: rozszerzonej metody odcisku palca mapy peptydowej związanej w przeszukiwaniem baz danych, bądź przeprowadzenie sekwencjonowania peptydów *de novo*. W pierwszym kroku metody PMF następuje wybranie określonego jonu, który podlega fragmentacji. Następnie w bazach danych wyszukiwane są wszystkie sekwencje o takiej samej masie jak wybrany jon, po czym podlegają teoretycznej fragmentacji, a następnie porównywane są z rzeczywistą fragmentacją na widmie MS/MS. Do tego celu wykorzystywane są programy MASCOT, SEQUEST, czy X!Tandem (Hjerno i Jensen, 2007). W przypadku sekwencjonowania *de novo* nie są używane bazy danych, ale surowe dane, pochodzące z widm MS/MS. Technika ta polega na otrzymaniu widma fragmentacyjnego charakteryzującego się dobrą jakością, a następnie na jego manualnej analizie, polegającej na przypisaniu sygnałom na widmie odpowiednich sekwencji. Ze względu na problemy wynikające z działania algorytmów, a także konieczność uzyskiwania danych o bardzo wysokiej jakości, metoda ta posiada wiele

ograniczeń i obecnie często zastępowana jest metodami opierającymi się o bazy danych (Seidler i in., 2010).

Do dwóch największych proteomicznych baz danych, umożliwiających identyfikację białek należą baza SwissProt (Boeckmann i in., 2003) oraz amerykańska baza NCBI (ang. *National Center for Biotechnology and Information*). W przypadku kiedy bazy proteomiczne nie są wystarczające do identyfikacji poszukiwanego białka, wykorzystywane mogą być także bazy danych zawierające sekwencje nukleotydowe, czy genomowe bazy danych. Istnieją także bazy danych dedykowane konkretnym gatunkom, zwłaszcza modelowym, a przykład mogą stanowić bazy stworzone dla rzodkiewnika pospolitego: AtProteome (Baerenfaller i in., 2008), ProMEX (Hummel i in., 2007) i ryżu: OryzaPG-DB (Helmy i in., 2011). Sekwencje genów jęczmienia, a także innych roślin zbożowych zdeponowano m.in. w bazie EnsemblPlants czy PlantGDB, wraz z informacjami dotyczącymi *locus* na chromosomie oraz kodowanych białek (Duvick i in., 2008; Kersey i in., 2014).



Ryc. 1.6. Identyfikacja białek metodą odcisku palca mapy peptydowej (*Peptide Mass Fingerprinting*) (według Noga i Sucharski, 2010).

1.3.4. Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do identyfikacji białek biorących udział w odpowiedzi na stres suszy

Na skutek działania czynników stresowych, takich jak susza dochodzi do zaburzenia procesów komórkowych, będących efektem zmian w regulacji ekspresji wielu genów. Zmiany te prowadzą do syntezy, akumulowania oraz zwiększonej aktywności specyficznych białek, mogących stanowić biomarkery, będące wskaźnikiem procesów

biologicznych, zachodzących w komórce pod wpływem stresu środowiskowego. Dzięki wykorzystaniu narzędzi proteomicznych i technik spektrometrii mas możliwe jest sporządzenie profili białkowych badanych roślin, pozwalających określić zróżnicowanie poziomu akumulacji określonych białek. Poznanie białek zaangażowanych w kluczowe procesy odpowiedzi rośliny na stres pozwoli na identyfikację markerów związanych z odpornością na deficyt wody, które wykorzystane mogą być do hodowli nowych odmian, jako narzędzie do selekcji odpornych genotypów.

Analizy proteomiczne zmierzające do wyselekcjonowania białek odpowiadających na stres środowiskowy powinny być prowadzone na roślinach posiadających kontrastujące fenotypy, np. genotyp wykazujący zwiększoną odporność na suszę i wrażliwy. Ponadto często wybierane są odmiany pochodzące z różnych rejonów świata, w celu zidentyfikowania nie tylko białek różnicujących rośliny poddawane stresowi i kontrolne, ale także takie, które różnicują genotypy. Przeprowadzone do tej pory doświadczenia pozwoliły na identyfikację wielu klas białek zaangażowanych w odpowiedź roślin na stres suszy, m.in.: białka zaangażowane w mechanizmy obronne, ekspresję genów, czy metabolizm pierwotny i wtórny. Różnego rodzaju podejścia proteomiczne wykorzystane zostały do poznania reakcji białek na stres suszy u różnych gatunków roślin (Rodziewicz i in. 2014). Przykład mogą stanowić badania przeprowadzone na 15 różnych odmianach jęczmienia, gdzie wykorzystując podejście typu „bottom-up” wyodrębniono grupy białek różnicujących genotypy wrażliwe od odpornych. I tak białka pełniące funkcje obronne, związane z fotosyntezą i metabolizmem pierwotnym wykazywały zwiększony poziom akumulacji u odmian bardziej tolerancyjnych (Kausar i in., 2013). W analizie typu „shotgun” przeprowadzonej na dwóch skrajnie różnych odmianach grochu zwyczajnego wykazano, że zwiększony poziom akumulacji białek zaangażowanych w proces fotosyntezy, enzymów antyoksydacyjnych i białek związanych z procesami syntezy i fałdowania wykazywały rośliny o genotypie bardziej tolerancyjnym na deficyt wody (Zadrażnik i in., 2013). Badania przeprowadzone na pszenicy także wykazały znaczące zmiany w poziomie akumulacji białek pomiędzy odmiennymi genotypami. Odmiana tolerancyjna charakteryzowała się większą liczbą białek odpowiadających na deficyt wody w porównaniu do odmiany wrażliwej, ponad 4 razy więcej białek wykazywało wzrost poziomu akumulacji. Stosując znaczniki izobaryczne w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią cieczą sprężoną ze spektrometrem mas zidentyfikowano klasy białek szoku cieplnego, białek związanych z przekazywaniem sygnałów i białek zaangażowanych w metabolizm wtórny flawonoidów, które w odpowiedzi na stres wykazywały zwiększony

poziom akumulacji. Znaczące różnice obserwowane były także w profilu akumulacji białek zaangażowanych w syntezę ściany komórkowej, co świadczyć może o różnicach w jej budowie u zróżnicowanych genotypów roślin i jej znaczeniu w tolerowaniu suszy (Alvarez i in., 2014). W innych badaniach dotyczących pszenicy, wykorzystując podejście „shotgun” wykazano, że odmiany tolerancyjne charakteryzowały się największą liczbą białek odpowiadających na stres suszy, przy czym wzrost poziomu akumulacji wykazywały białka obronne i enzymy antyoksydacyjne, natomiast spadek poziomu akumulacji - białka zaangażowane w proces fotosyntezy i cykl Calvina (Ford i in., 2011). Charakterystyczne białka, wykazujące duże zróżnicowanie akumulacji pomiędzy genotypami tolerancyjnymi i wrażliwymi są często obiektem dalszych badań, zwykle na poziomie inżynierii genetycznej. W tym wypadku kodujące je geny poddawane są nadekspresji lub wprowadzane są do innych gatunków, a uzyskane rośliny transgeniczne są testowane pod kątem odporności na określony stres środowiskowy. W ten sposób testowane były funkcje białek obronnych, takich jak białka szoku cieplnego (HSP, ang. *Heat Shock Proteins*), białka późnej embriogenezy, zmiatacze wolnych rodników, czy enzymy uczestniczące w syntezie związków osmotycznie czynnych. Na przykład, poziom akumulacji białka HSP70 w siewkach jęczmienia uległ wzrostowi tylko u roślin o genotypie tolerancyjnym na deficyt wody (Ashoub i in., 2013). Co więcej, u roślin tytoniu z nadekspresją genu kodującego HSP70 zauważono zwiększoną witalność w warunkach suszy (Cho i Hong, 2006). Badania przeprowadzone na transgenicznym ryżu z nadekspresją genu *HVA1* kodującego białko z rodziny LEA, wykazały zwiększoną tolerancję na deficyt wody w porównaniu do roślin kontrolnych, co związane było z szybszym wzrostem roślin oraz znacznie niższym poziomem uszkodzeń wynikających z działania suszy (Xu i in., 1996). W doświadczeniu prowadzonym na siewkach jak i dojrzałych roślinach jęczmienia o różnym stopniu odporności na suszę zauważono zwiększoną akumulację transkryptów dwóch genów kodujących dehidryny Dhn3 i Dhn4 tylko u odmian tolerancyjnych, co korelowało także z parametrami takimi jak względna zawartość wody oraz indeks pogodowy plonu (Park i in. 2006).

W warunkach stresu w roślinach następuje zmożona synteza związków osmotycznie czynnych, takich jak prolina czy betaina glicynowa, które pełnią kluczową rolę w tolerowaniu niekorzystnych warunków środowiskowych. W przypadku transgenicznego tytoniu z nadekspresją genu syntetazy delta-1-pirolidyno-5-karboksyłanu, zauważono 18-krotnie wzmożoną syntezę proliny w stosunku do roślin kontrolnych. Rośliny charakteryzowały się zwiększonym potencjałem osmotycznym liści oraz wzrostem

biomasy korzeni, co może wskazywać na wyższą odporność na stres osmotyczny, wywołany deficytem wody (Kishor i in., 1995). Na skutek działania stresu suszy, skutkującego stresem osmotycznym, dochodzi do generowania dużych ilości wolnych rodników. Badania na transgenicznym roślinach wykazują, że nadekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, związana jest z poprawą wydajności działania mechanizmów usuwania reaktywnych form tlenu, co może przekładać się na uzyskiwanie roślin o wyższym plonie, a tym samym bardziej odpornych na stres suszy (Badawi i in., 2004; Wang i in., 2006; Prashanth i in., 2008; Melchiorre i in., 2009). I tak w przypadku tytoniu z nadekspresją genu kodującego peroksydazę askorbinianową, zauważono poprawę wydajności układu fotosyntetyzującego, charakteryzującego się większą szybkością asymilacji CO₂, czy przewodnością szparkową. W konsekwencji transgeniczne rośliny charakteryzowały się wyższą masą nasion w stosunku do roślin kontrolnych (Yan i in., 2003).

Stosując różnorodne połączenia metod separacji białek i technik spektrometrii mas możliwe jest przeprowadzenie analizy porównawczej proteomu roślinnego, ujawniającej zmiany w poziomie ekspresji białek, odpowiadających na określony czynnik środowiskowy. Jednakże ze względu na dużą zmienność i dynamizm proteomu, uzyskiwane wyniki badań nie zawsze są jednoznaczne. Na przykład, problemem może być jednoznaczne stwierdzenie, które z odpowiadających białek są związane z odpornością na suszę, a które są tylko wskaźnikiem niedoboru wody. Często dodatkową przyczyną problemów w interpretacji wyników jest zbyt mała ilość genotypów, na której prowadzone są badania. Ponadto w wielu przypadkach eksperymenty wykonywane są w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Takie podejście nie odzwierciedla w pełni procesów jakie zachodzą w roślinie w warunkach polowych, a genotypy uznane za tolerancyjne mogą nie wykazywać takich cech w naturalnym środowisku. Innym rodzajem ograniczenia jest niewielka liczba zsekwencjonowanych genomów roślinnych. Najwięcej badań prowadzonych jest na roślinach, których genomy zostały poznane, m.in., rzodkiewnik pospolity (The International Genome Initiative, 2000), kukurydza (Schnable i in., 2009), sorgo (Bedell i in., 2005), soja (Schmutz i in., 2010), pomidor (International Tomato Genome Sequencing Project, 2012), ryż (Goff i in., 2002), topola (Tuskan i in., 2006), ziemniak (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011), czy jęczmień (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Wzrost ilości dostępnych sekwencji genomowych, zwłaszcza roślin o znaczeniu gospodarczym, ma kluczowe

znaczenie dla poszerzenia obszaru prowadzonych badań i z pewnością przyczyni się do przyspieszenia postępu dokonującego się w zakresie badań proteomów roślinnych.

1.4. Metody hodowli roślin o zwiększonej tolerancji na stres suszy

Prognozy demograficzne przewidują, że w roku 2050 populacja ludzka wzrośnie do poziomu 9 miliardów ludzi. Dlatego uważa się, że w świecie w którym przyrost naturalny przewyższa podaż żywności, produkcja roślinna musi zostać dwukrotnie zwiększona (Bengtsson i in., 2006). W tym celu konieczne jest minimalizowanie strat upraw poprzez lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstaw odporności roślin. Zapotrzebowanie na opracowywanie metod uzyskiwania nowych odmian roślin ciągle wzrasta i pomimo dużego postępu hodowlanego, jest nadal obiektem intensywnych prac genetyczno-hodowlanych, zmierzających do racjonalnego udoskonalania roślin. Stresy abiotyczne, a przede wszystkim stres suszy jest głównym czynnikiem ograniczającym wzrost, rozwój oraz produktywność roślin, co związane jest z dużymi stratami ekonomicznymi. Ze względu na pogarszające się warunki wodno-klimatyczne, a także zwiększające się zapotrzebowanie na żywność konieczne jest stworzenie nowych odmian roślin, które odporne będą na niesprzyjające warunki środowiskowe.

W celu uzyskiwania odmian roślin o określonych cechach, wyróżnia się trzy zasadnicze podejścia: hodowlę klasyczną, hodowlę z wykorzystaniem markerów molekularnych oraz tworzenie nowych odmian roślin metodami inżynierii genetycznej. Klasyczna metoda hodowli polega na krzyżowaniu roślin o określonych cechach i ma na celu uzyskanie osobników potomnych posiadających różne kombinacje korzystnych cech form rodzicielskich. Uzyskane linie genetyczne są następnie poddawane selekcji na podstawie posiadanych cech fenotypowych. Poprzez tradycyjne krzyżowanie uzyskano wiele nowych odmian roślin o zwiększonej odporności na suszę, m.in. ciecierzycę, fasolę, soję, orzecha ziemnego. Jednakże stosowanie tego podejścia niesie za sobą wiele ograniczeń. Jednym z nich są trudności w selekcji genotypów, które oprócz określonej, korzystnej cechy mogą posiadać cechy niepożądane. Ponadto uzyskanie nowych odmian, charakteryzujących się ulepszonymi cechami wymaga przeprowadzania wielu cykli rozmnażania i selekcji, a także populacji roślin o dużej zmienności genetycznej (Ashraf, 2010; Tuberosa i Salvi, 2006).

Zastąpienie tradycyjnych metod hodowli przez techniki biologii molekularnej pozwala na skrócenie cyklu hodowlanego roślin oraz na selekcję w oparciu o cechy genetyczne. Tolerancja na stesy abiotyczne, w tym stres suszy kontrolowana jest przez wiele genów, które współdziałają ze sobą w celu wytworzenia jednej cechy. Wykorzystanie hodowli wspomaganej markerami (MAB, ang. *Marker-Assisted Breeding*) pozwala na przeszukiwanie wielu tysięcy miejsc na chromosomach, których zmienność może być powiązana z cechą ilościową, której wartość fenotypowa jest wypadkową współdziałania wielu genów i czynników środowiskowych. Regiony chromosomów warunkujące te cechy określane są jako loci cech ilościowych (QTL, ang. *Quantitative Trait Locus*). Metoda QTL pozwala na określenie miejsca, liczby oraz wielkości efektu fenotypowego, a także na analizę cech warunkowanych wielogenowo. Mapowanie z wykorzystaniem QTL opiera się o krzyżowanie roślin o skrajnie różnych genotypach, a następnie o analizę potomstwa, u którego pożądana cecha uległa segregacji. W badaniach analizowane są duże populacje, składające się z co najmniej 100 osobników. Populacja mapująca poddawana jest genotypowaniu i na tej podstawie tworzone są mapy genetyczne, pozwalające na identyfikację konkretnych *loci* kontrolujących daną cechę (Ashraf, 2010; Cattivielli i in. 2008). Mapowanie markerami QTL w kierunku tolerancji na stres suszy przeprowadzone zostało dla wielu gatunków roślin, m.in. dla pszenicy (Teulat i in., 1997), jęczmienia (Sari-Gorla i in., 1999), kukurydzy (Quarrie i in., 1994), bawełny (Saranga i in., 2001), sorgo (Sanchez i in., 2002) i ryżu (Barnier i in., 2008). W analizie QTL wyróżnia się także białkowe *loci* cechy ilościowej (PQLs, ang. *Protein Quantity Loci*) i mataboliczne *loci* cechy ilościowej (mQTL, ang. *Metabolic Quantity Loci*). Białkowe locus cechy ilościowej może stanowić ważne narzędzie wykorzystywane w poszukiwaniu genów kandydatów do analizy QTL. Przykład może stanowić praca, w której badania proteomu przyczyniły się do opracowania PQL, a tym samym znalezienia genów potencjalnie związanych za odpowiedzialnością kukurydzy na stres suszy (de Vienne i in., 1999).

Trzecim podejściem zmierzającym do uzyskiwania roślin o zwiększonej odporności na stres środowiskowy jest transformacja genetyczna, polegająca na przenoszeniu określonego genu do rośliny, z pominięciem etapu krzyżowania. Zaletą takiej metody jest możliwość wprowadzenia pożądanego genu. Transformacja prowadzona może być na dwa sposoby. Pierwszy to podwyższona lub obniżona ekspresja genów kodujących białka pełniące funkcje obronne w stresie suszy (białka późnej embriogenezy, zmiatacze wolnych rodników, enzymy zaangażowane w syntezę osmolitów), natomiast druga dotyczy genów regulatorowych, np. czynników transkrypcyjnych. Wykorzystanie takiej technologii

przyczyniło się do uzyskania wielu linii poszczególnych gatunków roślin odpornych na stres suszy. I tak transgeniczny ryż z nadekspresją genu *HVA1* kodującego białko z rodziny LEA pochodzący z jęczmienia, wykazywał zwiększoną tolerancję na deficyt wody, objawiającą m.in. zwiększoną zawartością wody w liściach oraz mniejszą redukcją wzrostu rośliny w porównaniu do kontroli (Babu i in., 2004). Nadekspresja genu kodującego peroksydazę askorbinianową w tytoniu, skutkowała ponad 3-krotnym wzrostem akumulacji enzymu, co związane było z wyższym poziomem aktywności fotosyntetycznej oraz zredukowaną ilością wolnych rodników (Badawi i in., 2004). Transformacja genetyczna genów regulatorowych dotyczy w dużej mierze czynników transkrypcyjnych typu DREB, które odrywają znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów w warunkach suszy. Wzmoczona ekspresja czynników transkrypcyjnych DREB skutkowała zwiększoną odpornością na niedobór wody u wielu gatunków roślin, np. pszenicy (Pellegrineschi i in., 2004), ryżu (Oh i in., 2009), czy kukurydzy (Qin i in., 2007).

2. CEL PRACY

Nadrzędnym celem niniejszej pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie białek korzenia zaangażowanych w molekularne mechanizmy odpowiedzi jęczmienia jarego na warunki niedoboru wody. Analizy prowadzone były na dwóch liniach rodzicielskich jęczmienia, zróżnicowanych pod względem odporności na stres suszy: Maresi i Cam/B1/CI, dwóch odmianach referencyjnych: Sebastian i Stratus oraz na 89 liniach populacji mapującej, uzyskanych poprzez skrzyżowanie linii Maresi i Cam/B1/CI. Zastosowane techniki elektroforetyczne umożliwiły sporządzenie map proteomicznych korzeni jęczmienia, pozwalających określić zainicjowane niedoborem wody zróżnicowanie akumulacji poszczególnych białek. Wykorzystanie wysokorozdzielczych technik spektrometrii mas przyczyniło się do identyfikacji szeregu specyficznych białek, reagujących w warunkach stresowych zmianą profilu akumulacji.

Niniejsze badania stanowią część wielodyscyplinarnego projektu POLAPGEN-BD, mającego na celu kompleksowe zbadanie mechanizmów tolerancji zbóż na niedobór wody. Poznanie charakterystycznego wzoru zmian profili akumulacji białek poszczególnych odmian i linii jęczmienia w połączeniu z danymi uzyskanymi z innych zadań projektu, umożliwi wyselekcjonowania potencjalnych białek-markerów, będących wskaźnikami procesów biologicznych zachodzących w komórce roślinnej w warunkach stresu suszy. Białka takie mogą w przyszłości zostać wykorzystane podczas uzyskiwania nowych odmian roślin uprawnych, jako potencjalne markery odporności. Systemowe podejście projektu zakłada integrację danych uzyskiwanych na różnym poziomach molekularnych, w połączeniu z danymi anatomicznymi, morfologicznymi oraz dotyczącymi właściwości uzyskanego plonu.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1. Stosowane odczynniki

Odczynniki stosowane podczas ekstrakcji białek:

- chlorek potasu: Bioshop, Kanada,
- sacharoza: Bioshop, Kanada,
- Tris: Bioshop, Kanada,
- kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA): Bioshop, Kanada,
- fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF): Bioshop, Kanada,
- etanol (czda): Polskie Odczynniki Chemiczna, Polska,
- fenol, Bioshop, Kanada,
- 8-hydroksychinolina, Sigma-Aldrich, Niemcy,
- protease Inhibitor mix, Sigma-Aldrich, Niemcy.

Odczynniki stosowane do strącania białek:

- octan amonu: Bioshop, Kanada,
- metanol (czda): Polskie Odczynniki Chemiczna, Polska.

Odczynniki stosowane do oczyszczania białek:

- octan amonu: Bioshop, Kanada
- metanol (czda): Polskie Odczynniki Chemiczna, Polska,
- poliwinylpirolidon: Sigma-Aldrich, Niemcy.

Odczynniki stosowane do rozdzielania białek w pierwszym kierunku elektroforezy dwukierunkowej:

- mocznik: Bioshop, Kanada,
- tiomocznik: Bioshop, Kanada,
- CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate): Bioshop, Kanada,
- zestaw do mierzenia stężenia białka (2D Quant Kit): GE Healthcare Life Sciences, USA,
- ditiotreitol (DTT): Bioshop, Kanada,
- amfolit, zakres pH 4-7 (IPG Buffer): GE Healthcare Life Sciences, USA,
- bromofenol blue: Bioshop, Kanada,
- Tris: Bioshop, Kanada,
- glicyna: Biosohp, Kanada,
- dodecylosiarczan sodu (SDS): Bioshop, Kanada,
- paski żelowe, długość 11cm, zakres pH 4-7, gradient liniowy (Immobiline DryStrip Gels): GE Healthcare Life Sciences, USA,
- olej do pokrycia pasków żelowych Immobiline DryStrip Cover Fluid: GE Healthcare Life Sciences, USA.

Odczynnik stosowane do rozdzielania białek w drugim kierunku elektroforezy dwukierunkowej:

- tris: Bioshop, Kanada,
- glicyna: Bioshop, Kanada,
- dodecylosiarczan sodu (SDS): Bioshop, Kanada,
- ditiotreitol (DTT): Biohop, Kanada,
- jodoacetamid (IAA): Bioshop, Kanada,
- mocznik: Bioshop, Kanada,
- glicerol, Bioshop, Kanada,

- bromofenol blue: Bioshop, Kanada,
- akrylamid/bisakrylamid (Akrylamide/Bis-acrylamide premix powder 37,5:1): Bioshop, Kanada,
- siarczan amonu (APS): Bioshop, Kanada,
- *N,N,N',N'* – tetrametyloetylenodiamina (TEMED): Bioshop, Kanada,
- agarozą: Bioshop, Kanada,
- standard białkowy: GE Healthcare Life Sciences, USA.

Odczynniki stosowane do utrwalania białek:

- kwas octowy: Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska,
- etanol (czda): Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska.

Odczynniki stosowane do barwienia białek:

- błękit Coomassie w wersji koloidalnej (BBB-G): Bioshop, Kanada,
- siarczan amonu: Bioshop, Kanada,
- kwas ortofosforowy: Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska,
- metanol (czda): Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska.

Odczynniki stosowane do trawienia enzymatycznego białek:

- acetonitryl (czystość LC/MS): Sigma-Aldrich, Niemcy,
- dwuwęglan amonu: Sigma-Aldrich, Niemcy,
- trypsyna: Promega, Niemcy.

Odczynniki stosowane do analizy MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF:

- acetonitryl: Bruker Daltonics, Niemcy,
- kwas α -cyjano-4- hydroksycynamonowy: Bruker Daltonics, Niemcy,
- standardy mas peptydów w zakresie 700-3600Da (*ang. Peptide Calibration Standards*): Bruker Daltonics, Niemcy.

Do wszystkich stosowanych odczynników wykorzystywana była woda dejonizowana w systemie Mili-Q Plus (Milipore, USA).

3.2. Materiał roślinny i warunki hodowli

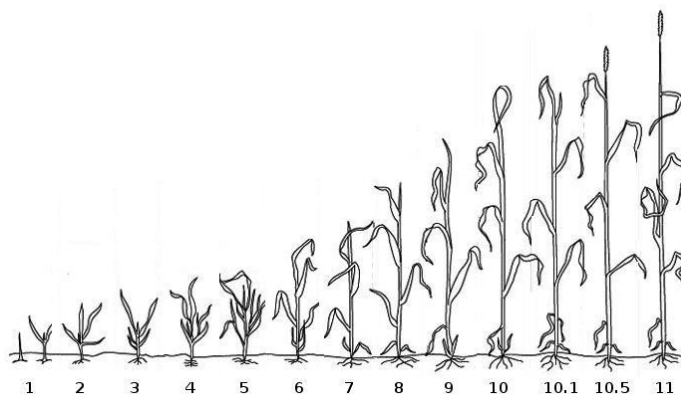
Rośliny wykorzystane w przeprowadzonych eksperymentach hodowane były w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu w ramach projektu POLAPGEN-BD, przez pracowników z Zespołu Fenotypowania i Genotypowania Zbóż z Zakładu Biotechnologii.

Badania prowadzone były na korzeniach dwurzędowego jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.):

- 2 odmiany rodzicielskie: Maresi (Niemcy), Cam/B1//CI08887/CI05761 (nazywany w dalszej części pracy Cam/B1/CI) (Syria)
- 2 odmiany referencyjne: Sebastian (Dania), Stratus (Polska)
- 89 linii wsobnych (RIL, *ang. Recombinant Inbred Line*) ósmego pokolenia (F₈), uzyskanych techniką pojedynczego ziarna ze skrzyżowania genotypów Maresi i Cam/B1/CI (populacja MCam).

Nasiona jęczmienia wysiewano do doniczek wypełnionych 8 kg piasku gliniastego pomieszanego z piaskiem suchym w stosunku wagowym 7:2. Zastosowanie takich proporcji użytej gleby zapewniło dobrą przewodność wody w doniczkach. W każdej doniczce wysiewano 25 roślin. Hodowla roślin prowadzona była w szklarni, w częściowo kontrolowanych warunkach temperatury. Optymalna wartość wilgotności gleby wynosiła w skali pF 2,2 (Krzywa pF - krzywa sorpcji wody - zależność pomiędzy siłą ssącą gleby, a jej wilgotnością, wyrażona w centymetrach słupa wody). Po 3 tygodniach wzrostu roślin, w stadium fazy trzech liści (1.3 w skali Feeksa) zapoczątkowano stres suszy. Wilgotność gleby obniżona została do wartości pF 3,2, co stanowi obszar wody trudno dostępnej dla rośliny, ale nie przekracza poziomu punktu trwałego wędnięcia, który wynosi w skali pF około 4,2. Stres utrzymywany był przez okres 10 dni. Rośliny kontrolne wzrastały przy optymalnej wilgotności gleby. Wilgotność gleby kontrolowana była codziennie przy pomocy miernika wilgotności gleby FOM/mts (*ang. Field Operated Meter for*

determination of moisture temperature and salinity of soils), wykorzystującego metodę reflektometryczną (EastTest, Instytut Agrofizyki, PAN). Korzenie zbierano w dwóch powtórzeniach biologicznych. Na każde powtórzenie biologiczne składała się pula 10 roślin wzrastających w jednej doniczce. Zebrany materiał zamrażano w ciekłym azocie, po czym przechowywano go w temperaturze -80°C .



Ryc. 3.1. Fazy rozwojowe zbóż według skali Feeksa. 1 – piórkowanie (faza 1-3 liści), 2-4 –krzewienie, 5-10 – strzelanie w źdźbło, 10.1-10.4 – kłoszenie, 10.5 – kwitnienie, 11- dojrzewanie (według Large, 1954).

3.3. Izolacja i oczyszczanie białek

Ekstrakcja białek cytoplazmatycznych jęczmienia prowadzona była z zastosowaniem metody fenolowej (fenolizy), opracowanej przez Hurkmana i Tanakę (1986). W pierwszym etapie procedury zamrożone korzenie homogenizowano w ciekłym azocie przy pomocy młynka kulowego MM (model MM400, Retsch, Niemcy). Następnie odważano 600 mg sproszkowanej tkanki i zawieszano w 750 μl buforu ekstrakcyjnego (Tab. 3.1), zawierającego inhibitory proteaz. Po 10 minutach inkubacji na lodzie, do prób dodawano wodny roztwór fenolu z dodatkiem barwnika 8-hydroksychinoliny w stosunku 1:1, a następnie wytrząsano 10 minut w temperaturze pokojowej. Ekstrakt wirowano z prędkością 11,000 g (Universal, 320R Hettich, Niemcy), przez 10 minut, w temperaturze 4°C . Górą fazę fenolową (supernatant) zbierano, po czym ponownie wytrząsano z buforem ekstrakcyjny w stosunku 1:1, w celu usunięcia zanieczyszczeń. Po ponownym wirowaniu (11,000 g, 10 min., 4°C) warstwę fenolową zbierano do nowych próbek, po czym wytrącano poprzez dodanie pięciu objętości 0,1 M octanu amonu rozpuszczonego w lodowatym metanolu. Próbkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze -20°C .

Wytrącone białka wirowano przez 5 minut z prędkością 18,000g w temperaturze 4 °C. Następnie osad białkowy zbierano, przenoszono do nowej probówki i zawieszano w 1ml 0.1 M octanu amonu rozpuszczonego w metanolu. W celu usunięcia związków fenolowych, białka ponownie wirowano, zbierano i zawieszano w 1% roztworze poliwinylpirolidonu (pvp) rozpuszczonego w roztworze 0.1 M octanu amonu/MeOH. Zawieszony osad wirowano, zbierano i zawieszano w 0.1 M octanie amonu/MeOH. Tak przygotowany osad doczyszczano poprzez przemycie 80% roztworem acetonu.

Tab. 3.1. Skład buforu ekstrakcyjnego.

Sacharoza	700 mM
EDTA	50 mM
KCl	100 mM
β-merkaptioetanol	2% (w/v)
PMSF	1 mM
Tris-HCl pH 8.0	500 mM

3.4. Dwukierunkowa elektroforeza białek

Wyekstrahowane białka cytoplazmatyczne rozdzielane były metodą dwukierunkowej elektroforezy żelowej (2D-PAGE). W pierwszym kierunku białka rozdzielane były na paskach żelowych na podstawie posiadanego punktu izoelektrycznego (pI) w gradiencie mieszaniny amfolitów. W drugim kierunku białka rozdzielano w żelu poliakrylamidowym, na podstawie posiadanej przez nie masy cząsteczkowej. Dla każdego powtórzenia biologicznego roślin wzrastających w warunkach stresowych i kontrolnych, przeprowadzono dwa powtórzenia techniczne. Dla jednej odmiany/linii jęczmienia uzyskano 4 elektroforegramy dla roślin poddawanych stresowi suszy i 4 elektroforegramy dla roślin rosnących w warunkach kontrolnych.

3.4.1. Rozdział białek w pierwszym kierunku

Oczyszczony osad białkowy rozpuszczano w 300 μ l buforu rehydratacyjnego (Tab. 3.2) i wytrząsano 30 minut, do momentu uzyskania jednorodnego roztworu. Następnie przeprowadzono pomiar stężenia białka zawartego w próbce, stosując komercyjnie dostępny zestaw (2-D Quant Kit, GE Healthcare, Life Sciences, USA), którego mechanizm działania oparty jest o procedurę oznaczania stężenia białek metodą Lowry'ego. Jako standardu do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto surowiczą albuminę bydlęcą (BSA), w odpowiednio wzrastających stężeniach. Do pomiaru stężenia białka używano po 2 μ l badanych próbek. Wartość absorbancji mierzono przy długości fali równej 480 nm na spektrofotometrze DU-62 (Beckman, Niemcy).

Do rozdziału elektroforetycznego pobierano po 300 μ g białka rozpuszczonego w buforze rehydratacyjnym, 55 mM ditiotreitolu, 0,5% mieszaniny amfolitów o pH w zakresie 4-7 oraz 0,25% barwnika błękitu bromofenolowego. Próby uzupełniano odpowiednim buforem do objętości końcowej 200 μ l. Przygotowane próby wirowano 5 minut z prędkością 11 000 g, po czym nakładano na ceramiczne rynienki o długości 11 cm. Na rozproszoną po powierzchni rynienki próbkę nakładano paski żelowe z unieruchomionym gradientem pH 4-7 o długości 11 cm. W ostatnim etapie powierzchnię pasków żelowych nawilżano olejem. Białka ogniskowano w temp. 18 °C w aparacie Ettan IPGphor II System (GE Healthcare Life Sciences, USA) przez 19 godzin ze wstępną, trwającą trzy godziny rehydratacją pasywną (Tab. 3.3). Po rozdziale próby przechowywano w temp. -80 °C lub bezpośrednio wykonywano rozdział w drugim kierunku.

Tab. 3.2. Skład buforu rehydratacyjnego.

Mocznik	7 M
Tiomocznik	2 M
Chaps	2% (w/v)

Tab. 3.3. Parametry rozdzielania białek w aparacie Ettan IPGPhor II.

Stosowany typ napięcia	Napięcie (V)	Czas analizy (godz.)	kVh
-	0	3:00	0
Stale	50	9:00	0.45
Gradientowe	50-500	0:40	0.25
Stale	500	1:00	0.5
Gradientowe	500-1000	0:20	0.25
Gradientowe	1000-6000	2:30	8.8
Stale	6000	2:30	15
SUMA		19	24,8

3.4.2. Rozdział białek w drugim kierunku

Paski żelowe z rozdzielonymi białkami inkubowano dwukrotnie w buforze wyrównującym pH żelu (Tab. 3.4). W pierwszym etapie równoważenia bufor zawierał 1,5% ditiotreitola, co umożliwiło przeprowadzenie reakcji redukcji mostków dwusiarczkowych rozdzielonych białek. Po 15 minutach inkubacji zastosowano bufor zawierający 3,5% jodoacetamid, który umożliwił przeprowadzenie alkilacji wolnych grup tiolowych i zablokowania ponownego powstawania mostków siarczkowych. Po inkubacji paski żelowe przepłukiwano wodą dejonizowaną, po czym nakładano po dwa na 12% żel poliakrylamidowy (Tab. 3.5). Żele poliakrylamidowe wykorzystywane do rozdzielania były wykonywane w urządzeniu DALT Twelve Gel Caster (GE Healthcare Life Sciences, USA), w płytach o wymiarze 24 cm x 24 cm. Pomiędzy paskami żelowymi nakładano marker wielkości, składający się z mieszaniny białek o zakresie mas cząsteczkowych od 10 do 100 kDa. Paski żelowe unieruchamiano na żelu poprzez rozprowadzenie rozpuszczonej 1% agarozy. Po spolimeryzowaniu agarozy szyby elektroforetyczne z naniesionymi próbkami umieszczano w aparacie Ettan DALT twelve (GE Healthcare Life Sciences, USA). Rozdział białek zachodził w warunkach denaturujących. Do rozdzielania wykorzystano dwa bufor: bufor anodowy (Tab. 3.6) i katodowy (Tab. 3.7). Rozdział przebiegał w temperaturze 19 °C. Przez pierwsze pół godziny rozdzielania stosowano moc 2,5 W na płytę, a po tym czasie zwiększano ją do 15 W na płytę. Czas rozdzielania wynosił ok. 3

godziny i trwał do momentu rozwinięcia żelu na odległość 11 cm. Po zakończonym rozdziale żele inkubowano przez 3 godziny w roztworze do utrwalania (Tab. 3.8). W celu wizualizacji rozdzielonych białek, żele barwiono w naturalnym barwniku – błękitie Coomassie w wersji koloidalnej (BBB-G). Żele inkubowano z lekkim wytrząsaniem przez 12 h w 100 ml roztworu Coomassie/metanol użytego na jeden żel (Tab. 3.9). Po związaniu się barwnika z białkami, nadmiar barwnika był zlewany, a tło żeli odłukiwane poprzez inkubację w wodzie. Po całkowitym odłukaniu tła, żele skanowano na optycznym skanerze Image Scanner III (GE Healthcare, Life Sciences), wykorzystując program LabScan (GE Healthcare, Life Sciences), stosując rozdzielczość 300 dpi i czerwony filtr. Żele przechowywano w roztworze 2% kwasu fosforowego, w temperaturze 4 °C.

Tab. 3.4. Skład buforu wyrównującego.

Mocznik	6 M
Glicerol	29,3% (v/v)
Tris-HCl pH 8.8	75 mM
SDS	2% (w/v)
1% bromofenol blue stock	0,002% (w/v)

Tab. 3.5 Skład żelu poliakrylamidowego.

Akrylamid/Bisakrylamid (40%)	12%
Tris-HCl, pH 8.8 (1.5M)	40 mM
SDS (10%)	0,01% (v/v)
APS (5%)	0,05% (v/v)
Temed	0,07% (v/v)

Tab. 3.6 Skład buforu anodowego.

Tris	25 mM
------	-------

Tab. 3.7 Skład buforu katodowego.

Tris	250 mM
Glicyna	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

Tab. 3.8 Skład roztworu utrwalającego.

Kwas octowy (99%)	10% (v/v)
Etanol (96%)	50% (v/v)

Tab. 3.9. Skład barwnika Coomassie w wersji koloidalnej.

Coomassie BBB-G 250	0,1% (w/v)
Siarczan amonu	10% (w/v)
Kwas ortofosforowy (85%)	2% (w/v)

3.5. Analiza statystyczna elektroforegramów

W celu wyselekcjonowania białek wykazujących zmiany profilu akumulacji w suszy w badanych genotypach (Maresi, Cam/B1/CI, Sebastian, Stratus) i w liniach populacji mapującej MCam wykorzystano program Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences, USA). Do komputerowej analizy wykorzystano 8 żeli każdej badanej odmiany/linii jęczmienia (4 elektroforegramy uzyskane z roślin wzrastających w

warunkach stresu suszy i 4 elektroforegramy z roślin wzrastających w warunkach kontrolnych).

W pierwszym etapie przeprowadzonej analizy następowało automatyczne wykrywanie plamek białkowych, poprzez zastosowanie odpowiednich wartości parametrów: wygładzenie plamek (ang. *smooth*) – 4, krzywizna plamek (ang. *saliency*) – 30-40, minimalna powierzchnia plamki (ang. *minimal area*) – 20. Następnie na każdy żel naniesiono po 4-5 znaczników (ang. *landmark*) - charakterystycznych plamek białkowych, znajdujących się w tym samym miejscu na każdym elektroforegramie, które w znacznym stopniu poprawiają dokładność dopasowywania białek. W kolejnym kroku następowało automatyczne dopasowanie plamek białkowych (ang. *matching*), pomiędzy powtórzeniami żeli uzyskanych dla roślin wzrastających w warunkach stresu suszy i w warunkach kontrolnych, a także pomiędzy warunkami eksperymentalnymi (susza vs kontrola). W celu zwiększenia dokładności analizy, a tym samym zwiększenia trafności dopasowania plamek białkowych, dokonano dodatkowej korekcji, polegającej na usuwaniu lub dodawaniu plamek i zestawów połączeń (ang. *matchset*), które nie zostały lub zostały błędnie uwzględnione przez algorytm. Parametrem na podstawie, którego oceniano względny poziom akumulacji białek był „procent objętościowy” (ang. *% of volume*), uwzględniający powierzchnię oraz intensywność wybarwienia plamki białka w odniesieniu do całego żelu. Parametr ten charakteryzuje się tym, że jest względnie niezależny od zmienności poziomu wybarwienia powtórzeń żeli, które mogą wynikać m.in. z błędów powstałych podczas procedury barwienia żeli. Analiza statystyczna różnic pomiędzy poziomem akumulacji białek w suszy i kontroli była przeprowadzana za pomocą testu t-Studenta. Różnice w poziomie akumulacji białek były uważane za istotne gdy p-wartość była mniejsza bądź równa 0,05 i stosunek pomiędzy najniższą znormalizowaną wartością jednej grupy żeli, w której akumulacja danego białka była większa i najwyższą znormalizowaną wartością drugiej grupy, w której to samo białko charakteryzowało się niższym poziomem akumulacji, wynosił przynajmniej 1,5 (ang. *ratio*), co w większości przypadków odpowiadało przynajmniej dwukrotnej zmianie w poziomie akumulacji w stosunku do kontroli.

3.5.1. Całościowa analiza zmian profili akumulacji białek

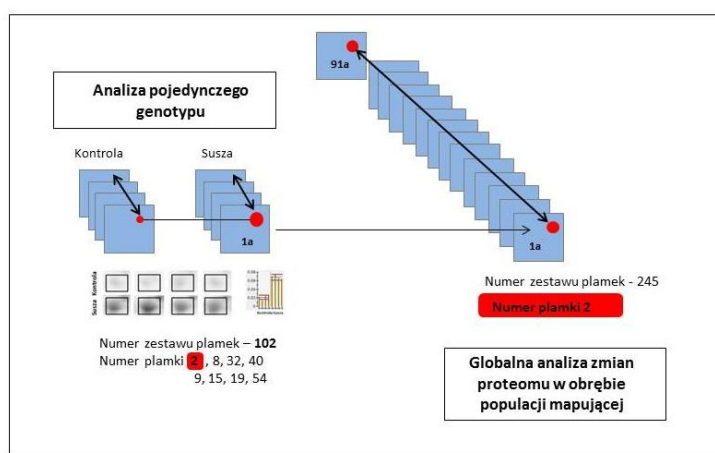
Przeprowadzenie całościowej analizy zmian proteomu w celu uzyskania profili akumulacji białek w liniach hodowlanych populacji mapującej i genotypach rodzicielskich wymagało opracowania sposobu analizy danych proteomicznych oraz wykorzystania dodatkowego oprogramowania. Podstawą do wykonania analiz w tym podejściu były wcześniej opracowane elektroforegramy w analizach pojedynczych genotypów (kontrola x susza).

Do analizy całościowej zmian proteomu wybrano 91 żeli referencyjnych (po jednym z każdego genotypu), które posiadały już wykryte plamki białkowe z nadaną numeracją i były składnikami zestawu plamek obejmującego profil akumulacji danego białka w poszczególnych analizach wykonanych w programie Image Master Platinum 2D dla pojedynczych genotypów. Wykryte plamki reprezentujące rozdzielone białka zostały dopasowane między użytymi obrazami żeli wszystkich linii populacji mapującej i odmian rodzicielskich (ang. *matching*). Poprawność utworzonych zestawów połączeń plamek pomiędzy elektroforegramami została następnie zweryfikowana poprzez ich usuwanie lub akceptację. W analizie całościowej 91 genotypów wykorzystano fakt, że każda dopasowana plamka pomiędzy określoną liczbą genotypów (ang. *matchset*), posiada ten sam numer porządkowy na tym żelu, który był wykorzystany w analizie danego genotypu podczas identyfikacji różnic w akumulacji białek wywołanych niedoborem wody. Na podstawie zgodności w numeracji możliwe było odszukanie odpowiedniego zestawu plamek wraz z wartościami „% objętościowego” w poszczególnych genotypach i utworzenie zbiorczego profilu akumulacji danego białka dla populacji mapującej i form rodzicielskich (Ryc. 3.2).

Kolejnym etapem było wyeksportowanie z programu Image Master Platinum 2D projektu zawierającego 91 żele (analiza niecelowana) i projektów, w których analizowano pojedynczo linie hodowlane populacji mapującej oraz odmiany rodzicielskie i tabel zawierających numerację zestawów połączeń pomiędzy plamkami (ang. *matchset table*) oraz plamek (ang. *spot tables*).

Wyodrębnienie profili akumulacji białek dla wszystkich genotypów oraz analizy statystyczne zostały przeprowadzone przez Prof. dr hab. Pawła Krajewskiego z Zakładu Biometrii z Instytutu Genetyki Roślin PAN z wykorzystaniem własnoręcznie opracowanych skryptów i programu GenStat 17 (VSN International, 2013).

Dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne (HCA, ang. *Hierarchical Clustering Analysis*) zostało przeprowadzone w programie R (*R Development Core Team, 2010*) dla efektu suszy wybranych białek. Grupowanie wykonano metodą średnich odległości pomiędzy obiektami w skupieniach na podstawie odległości euklidesowej. Spośród grupy białek o statystycznie istotnej interakcji susza \times genotyp, do analizy HCA wybrano 97, które były obserwowane w przynajmniej 50 liniach populacji mapującej. Dla takiego zbioru można było zastosować imputację brakujących obserwacji metodą bazującą na regresji wielorakiej (Beale i Little, 1975).



Ryc. 3.2. Schemat postępowania w analizie niecelowanej zmian proteomu w obrębie populacji mapującej jęczmienia. Kolorem czerwonym zaznaczono przykładowy numer plamki, dzięki której możliwe było odnalezienie odpowiedniego zestawu plamek w pojedynczej analizie badanych genotypów i wyodrębnienie profili zmian białek w warunkach stresu i kontroli.

3.6. Trawienie enzymatyczne białek

Uwidocznione na elektroforegramie plamki białkowe, wykazujące zmiany w poziomie akumulacji wycięte zostały z żelu przy pomocy skalpela, a następnie przełożone do probówek. W celu przygotowania próbek do enzymatycznego trawienia wykorzystano protokół opracowany przez Shevchenkę (Shevchenko i in., 1996). W pierwszym etapie wycięte kawałki żelu przemywano 100 μ l roztworu 50 mM diwęglanu amonu rozpuszczonym w acetonitrylu. Po 15 min roztwór był usuwany, a białka przemywano

acetonitrylem. Następnie dodawano 100 μ l 50 mM diwęglanu amonu i inkubowano przez 15 min. Całość usuwano, a białka przemywano dwukrotnie acetonitrylem, po czym suszono przez 5 min na koncentratorze próżniowym (Eppendorf 5301 Concentrator Centrifugal Evaporator, Niemcy). Do wysuszonych kawałków żelu dodawano 10 μ l trypsyny o stężeniu 20 ng/ μ l w 25 mM diwęglanie amonu i inkubowano w temperaturze 37 °C przez noc. Po okresie inkubacji do prób dodawano po 1 μ l acetonitrylu, po czym wirowano 1 min z prędkością 8,000 g (Eppendorf MiniSpin, Niemcy), a następnie próby poddano działaniu utradzwiązków. Próby przechowywano w temperaturze -20 °C.

3.7. Analiza białek metodami spektrometrii mas

Analizę białek przeprowadzono z wykorzystaniem systemu MALDI-TOF Autoflex i MALDI-TOF/TOF Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics, Niemcy), przy użyciu metody odcisku palca peptydowego (ang. *Peptide Mass Fingerprinting*). Próbkę do pomiarów spektrometrycznych nakładano metodą suchej kropli. Na płytkę Anchorchip (Bruker Daltonics, Niemcy) nakładano 0,5 μ l mieszaniny roztworu peptydów otrzymanych po trawieniu enzymatycznym białka, w połączeniu z nasyconym roztworem matrycy w stosunku 1:1 w celu ko-kryształizacji. Jako matrycę zastosowano kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy rozpuszczony w 50% acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwasu trifluorooctowego. Przed pomiarami spektrometr był kalibrowany przy użyciu standardów peptydowych (*Peptide Calibration Standards 1*, Bruker Daltonics, Niemcy) w zakresie mas 700-3600 Da. Jonizacja następowała w wyniku wzbudzenia próbek promieniami lasera azotowego w zakresie ultrafioletu o długości fali 337 nm. Wszystkie analizy przeprowadzono w dodatnim polu jonizującym z użyciem reflektromu, w celu zwiększenia rozdzielczości analizy i optymalizacji trajektorii lotu promieni jonów. Dla każdej próbki rejestrowano widma mas uzyskane w wyniku zsumowania przynajmniej 60 strzałów lasera. Widma masowe wykonywano w programie Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, Niemcy), a następnie opracowywano w programie Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics, Niemcy), w którym m.in. dokonywano kalibracji wewnętrznej, wykorzystując masy peptydów pochodzących od trypsyny i keratyny obecnych w próbce.

W celu poprawy rozdzielczości analiz, białka analizowano także na instrumencie typu MALDI-TOF/TOF. Wykorzystanie dwóch wysokorozdzielczych analizatorów czasu przelotu jonów, pozwoliło zarówno na przeprowadzenie analizy typu PSD jak również fragmentacji MS/MS wybranych pików, dzięki czemu poziom identyfikacji białek był znacznie wyższy.

3.7.1. Identyfikacja białek w bazach danych

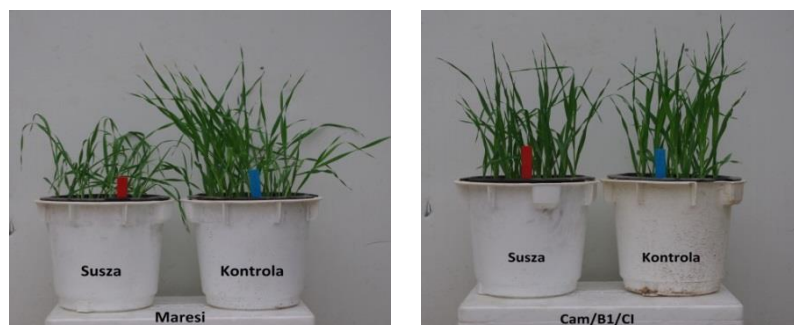
Do identyfikacji białek wykorzystywano oprogramowania BioTools 3.2 (Bruker Daltonics, Niemcy) oraz Matrix Science MASCOT Server 2.3 (in-house) (<http://www.matrixscience.com>), korzystających z białkowych i nukleotydowych baz danych, takich jak NCBI, czy SwissProt. Algorytm, za pomocą którego przeszukiwane były bazy danych uwzględniał ściśle określone parametry wyszukiwania. Obszar taksonomiczny został zawężony do roślin zielonych (*Viridiplantae*), określono enzym użyty do trawienia białka. Jako modyfikacje stałe ustalono karbamidometylację reszt cysteiny, a jako modyfikację prawdopodobną oksydację metioniny. Określono zakres tolerancji mas peptydów równy 0.2 Da, uwzględniono dodatni tryb pracy jonów oraz masę monoizotopową peptydów. W trybie analiz MS/MS analizowano pięć wybranych peptydów na każdą próbkę, a tolerancja pomiaru masy wynosiła 0.5 Da. Wygenerowane przez program wyniki uwzględniały określone parametry, potwierdzające stopień dopasowania identyfikacji białka. Głównym parametrem, który brano pod uwagę, jako określający identyfikację białka była liczba punktów przyznanych przez algorytm. Wyniki z 95% poziomem ufności ($p=95\%$) były traktowane, jako prawidłowa identyfikacja białka lub identyfikacja białka wykazującego wysoki stopień homologii z wyszukany w bazie danych. Ponadto uwzględniono stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej, liczbę zgodnych peptydów, wartość masy cząsteczkowej, czy punkt izoelektryczny.

4. WYNIKI

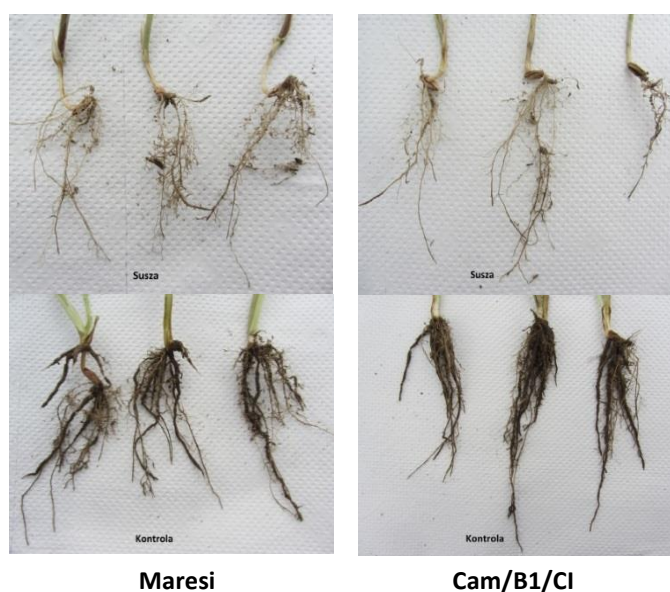
4.1. Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych

Przeprowadzona na pierwszym etapie badań analiza zmian profilu akumulacji białek korzenia dotyczyła dwóch linii rodzicielskich jęczmienia jarego: Maresi i Cam/B1//CI08887/CI05761 (Cam/B1/CI) i dwóch odmian referencyjnych: Sebastian i Stratus. Maresi jest niemiecką, dwurzędową odmianą jęczmienia, posiadającą gen półkarłowatości *denso*, zapewniający podwyższoną odporność na wyleganie. Syryjska linia hodowlana Cam/B1/CI, ze względu na miejsce pochodzenia, charakteryzuje się dość dobrym stopniem przystosowania do suchych warunków środowiskowych. Cechuje ją bujnie rozbudowany system korzeniowy, wykazujący zwiększoną efektywność wykorzystania wody. Podczas badań porównawczych odmian rodzicielskich stwierdzono, iż w warunkach deficytu wody, zarówno odmiana Maresi jak i Cam/B1/CI charakteryzuje się dość wysokim indeksem odporności na suszę. Jednakże odmiana syryjska cechuje się efektywniejszym współczynnikiem wykorzystania wody oraz azotu i fosforu w porównaniu do odmian europejskich. Ponadto wykazuje zwiększoną aktywność fotosyntetyczną (Górny, 2001, 2008). Sebastian jest wysokoplonującą odmianą browarną pochodzenia duńskiego, a Stratus jest odmianą polską, wykorzystywaną głównie na cele paszowe. Obie odmiany referencyjne charakteryzują się przypuszczalnie niską tolerancją na deficyt wody (Łukowska i Józefaciuk, 2013).

Zastosowane warunki stresu suszy w doświadczeniu szklarniowym przeprowadzonym w Instytucie Genetyki Roślin na dwóch liniach rodzicielskich, w większym stopniu wpłynęły na zahamowanie wzrostu i redukcję biomasy w przypadku odmiany Maresi. W przypadku linii syryjskiej Cam/B1/CI zauważono znacznie mniejszy poziom redukcji biomasy roślin wzrastających w warunkach deficytu wody w porównaniu do kontrolnych. W korzeniach obu badanych genotypów widoczne są różnice anatomiczne związane z utratą gęstości w przypadku roślin wzrastających w warunkach suszy w porównaniu do korzeni wzrastających w warunkach kontrolnych. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic pomiędzy korzeniami kontrolnymi obu badanych linii (Ryc. 4.1; Ryc. 4.2).



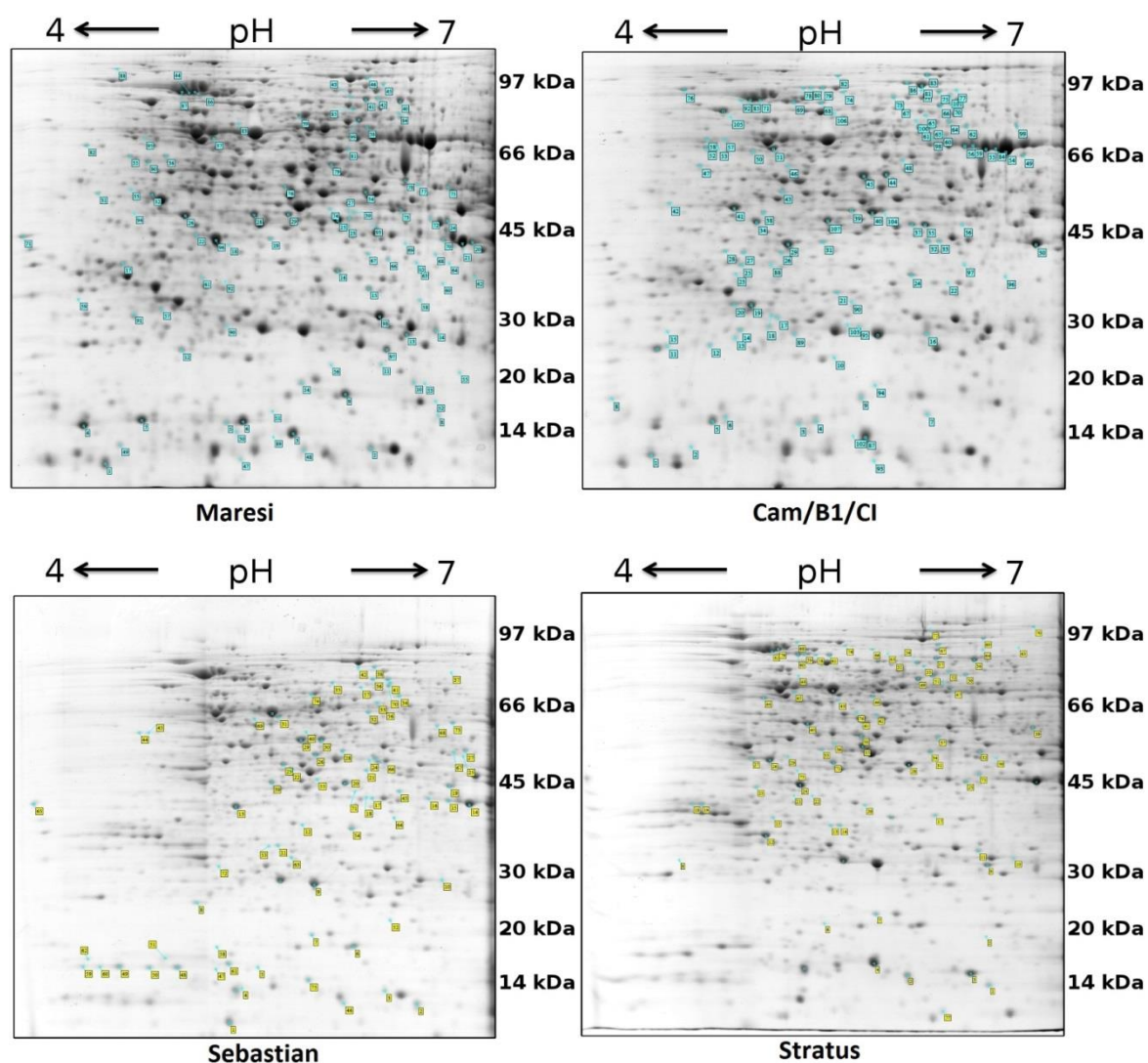
Ryc. 4.1. Odmiany rodzicielskie jęczmienia w warunkach kontrolnych i po 10 dniach utrzymywania stanu suszy.



Ryc. 4.2. Korzenie odmian rodzicielskich jęczmienia wzrastające w warunkach kontrolnych i po 10 dniach utrzymywania stanu suszy.

Zastosowanie dwukierunkowej elektroforezy żelowej połączonej z barwieniem białek błękitem Coomassie pozwoliło na wykrycie około 1000 plamek na elektroforegramach ekstraktów białkowych korzeni uzyskanych z roślin kontrolnych i wzrastających w warunkach stresu suszy. W celu wyselekcjonowania białek różnicujących rośliny wzrastające w warunkach suszy od roślin kontrolnych analizie statystycznej poddano intensywności wybarwienia plamek reprezentujących rozdzielone na żelach białka. W ten sposób w korzeniach czterech odmian jęczmienia znaleziono 335 białek wykazujących statystycznie istotne różnice w poziomie akumulacji. Wszystkie te białka analizowano metodą odcisku palca mapy peptydowej (PMF), metodyką MALDI-TOF i

MALDI-TOF/TOF. Wykonane analizy pozwoliły na identyfikację około 50% białek różnicujących. Białka wykazujące zmiany poziomu akumulacji w warunkach deficytu wody dla czterech badanych genotypów jęczmienia przedstawiono na obrazach elektroforetycznych (Ryc. 4.3) i w tabelach (Tab. 4.1 - 4.4) (rycina z obrazami elektroforetycznymi i table w większej rozdzielczości umieszczone zostały na płycie CD).



Ryc. 4.3. Elektroforegramy uzyskane podczas dwukierunkowego rozdzielania ekstraktów białkowych z korzeni badanych linii jęczmienia. Numeracja wskazuje plamki reprezentujące białka, które wykazały zmiany poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy.

Tab. 4.1. Białka, które wykazały zmiany poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy w korzeniach odmiany Maresi.

Numer białka	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola (%objętościowy)	Susza (%objętościowy)	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT	% pokrycia sekwencji	pl (teretyczny)	Mw (teoretyczna) Da	pl (eksperymentalny)	Mw (eksperymentalna) Da	Numer identyfikacyjny	Pozycja
1	Niezidentyfikowane		1,04E-02	0,182	0,308	1,69	WZROST						4,59	13232		
2	Niezidentyfikowane		3,84E-03	0,05	0,186	3,72	WZROST						6,3	14335		B2
3	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	<i>Triticum aestivum</i>	1,46E-05	0,047	0,487	10,36	WZROST	MALDI-TOF/TOF	106	15	5,8	16868	5,79	15498	HS16A_WHEAT	K8
4	Niezidentyfikowane	<i>Hordeum vulgare</i>	7,85E-06	0,027	0,403	14,93	WZROST						4,46	16395		
5	Białko szoku cieplnego 17.4 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,31E-03	0,039	0,152	3,90	WZROST	MALDI-TOF/TOF	148	15	5,36	17593	5,37	16754	HS17C_ARATH	C1
6	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	<i>Triticum aestivum</i>	8,90E-08	0,052	0,414	7,96	WZROST	MALDI-TOF/TOF	92	11	5,83	16868	5,48	16718	HS16A_WHEAT	
7	Białko odpowiadające na stres chłodu	<i>Hordeum vulgare</i>	2,39E-06	0,05	0,377	7,54	WZROST	MALDI-TOF	120	79	4,93	17659	4,82	16863	2::gi 10799810	I4
8	Oksydaza szczawianowa 1	<i>Zea mays</i>	2,61E-03	0,039	0,087	2,23	WZROST	MALDI-TOF	68	24	8,72	40424	6,74	17610	2::gi 226500726	
9	Czynnik inicjacji translacji	<i>Dasyphyrum brevistaratum</i>	1,61E-03	0,162	0,283	1,75	WZROST	MALDI-TOF	67	45	5,76	17599	6,14	19624	2::gi 74049040	
10	Reduktaza mononukleotydu flavinowego zależna od NADP	<i>Hordeum vulgare</i>	4,42E-03	0,024	0,062	2,58	WZROST	MALDI-TOF	78	45	6,28	18829	6,58	21032	2::gi 326508766	
11	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	<i>Brachypodium distachyon</i>	2,73E-03	0,021	0,046	2,19	WZROST	MALDI-TOF	86	29	5,78	20173	6,36	23185	2::gi 357137226	B3
12	Niezidentyfikowane		8,84E-04	0,044	0,099	2,25	WZROST						5,08	24795		
13	Niezidentyfikowane		4,68E-03	0,095	0,234	2,46	WZROST						6,54	27333		A1
14	Germina 8-5	<i>Oryza sativa</i>	7,77E-06	0,302	0,142	0,47	spadek	MALDI-TOF/TOF	120	7	6,4	24400	6,73	28666	GL85_ORYSJ	G1
15	Białka rybosomalne wiążące domenę S1 RNA	<i>Hordeum vulgare</i>	8,72E-03	0,046	0,094	2,04	WZROST	MALDI-TOF	158	65	5,95	25238	6,29	33770	2::gi 326502466	
16	Białka z rodziny hydrolaz trifosfonukleozydów zawierających pętle P (P-loop)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,30E-05	0,031	0,163	5,26	WZROST	MALDI-TOF	114	40	7,08	38699	6,08	36096	2::gi 326522022	I2
17	Białko z rodziny 14-3-3 (GF14-C)	<i>Oryza sativa</i>	1,59E-04	0,056	0,107	1,91	WZROST	MALDI-TOF/TOF	67	6	4,78	28979	4,71	36742	14333_ORYSJ	
18	Białko z rodziny białek zawierających motyw rozpoznający RNA (RRM)	<i>Hordeum vulgare</i>	5,52E-05	0,069	0,037	0,54	spadek	MALDI-TOF	73	30	5,82	41270	5,39	39976	2::gi 326487243	
19	Esteraza	<i>Hordeum vulgare</i>	1,96E-03	0,083	0,055	0,66	spadek	MALDI-TOF	78	44	5,56	35629	5,66	40934	2::gi 218194204	
20	Rycyna, podjednostka beta, domena wiążąca węglowodany	<i>Hordeum vulgare</i>	1,26E-03	0,098	0,24	2,45	WZROST	MALDI-TOF	241	69	6,27	39056	6,95	40873	2::gi 326497973	
21	Niezidentyfikowane		8,63E-03	0,29	1,265	4,36	WZROST						6,87	40632		
22	Chaperon	<i>Hordeum vulgare</i>	1,97E-02	0,058	0,131	2,26	WZROST	MALDI-TOF	113	56	5,15	31518	5,17	41116	2::gi 326506152	
23	Niezidentyfikowane		3,99E-04	0,108	0,072	0,67	spadek						6,13	42919		
24	Peroksydaza chrzanowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,53E-03	0,295	0,145	0,49	spadek	MALDI-TOF	159	43	6,33	39594	6,78	44208	2::gi 326499758	
25	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Brachypodium distachyon</i>	7,01E-05	0,14	0,568	4,06	WZROST	MALDI-TOF	89	48	8,07	43666	6,08	44077	2::gi 326506962	
26	Fruktokinaza	<i>Hordeum vulgare</i>	1,78E-03	0,788	0,444	0,56	spadek	MALDI-TOF	163	62	5,06	35907	5,1	44339	2::gi 326513418	H2
27	Niezidentyfikowane		1,50E-03	0,118	0,0573	0,49	spadek						6,14	44077		
28	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	<i>Oryza sativa</i>	1,49E-04	0,571	0,273	0,48	spadek	MALDI-TOF/TOF	63	8	5,97	25432	5,56	45000	SODM3_MAIZE	K7
29	Fruktokinaza	<i>Hordeum vulgare</i>	4,47E-03	0,247	0,151	0,61	spadek	MALDI-TOF	152	58	5,67	34933	5,77	44933	2::gi 326489677	
30	Rycyna, podjednostka beta, domena wiążąca węglowodany	<i>Hordeum vulgare</i>	1,20E-02	0,096	0,039	0,41	spadek	MALDI-TOF	113	38	5,71	35765	6,18	45591	2::gi 326517467	
31	Niezidentyfikowane		8,35E-03	0,012	0,041	3,42	WZROST						4,55	50063		
32	Białko późnej embriogenezy	<i>Hordeum vulgare</i>	1,61E-02	0,062	0,114	1,84	WZROST	MALDI-TOF	102	44	4,96	36225	4,9	49846	2::gi 326528557	
33	Niezidentyfikowane		6,14E-04	0,038	0,018	0,47	spadek						4,76	51165		
34	Niezidentyfikowane		1,03E-02	0,096	0,205	2,14	WZROST						6,25	50832		
35	Niezidentyfikowane		7,17E-04	0,021	0,061	2,90	WZROST						4,75	61964		I3
36	Niezidentyfikowane		1,10E-04	0,071	0,049	0,69	spadek						4,98	61964		
37	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Hordeum vulgare</i>	9,89E-03	0,122	0,079	0,65	spadek	MALDI-TOF/TOF	48	66	7,8	6430	5,29	69805	ATP5B_HORVU	A4
38	26S proteaza, podjednostka 4, homolog	<i>Hordeum vulgare</i>	2,99E-03	0,181	0,078	0,43	spadek	MALDI-TOF	112	38	5,91	49727	6,26	74735	1::PRS4_ORYSJ	
39	Dehydrogenaza aldehydu betaainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	1,65E-02	0,033	0,097	2,94	WZROST	MALDI-TOF	132	37	5,47	55276	5,84	80600	2::gi 15147871	K6
40	Niezidentyfikowane		6,550E-07	0,043	0,261	6,07	WZROST						6,47	87137		A2
41	Mutaza bisfosfoglicerynianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,38E-06	0,013	0,195	15,00	WZROST	MALDI-TOF/TOF	61	24	5,39	61316	6,25	88852	PNGI_MESCR	K3
42	Dehydrogenaza jablczanowa zależna od NADP	<i>Oryza sativa</i>	1,54E-04	0,028	0,107	3,82	WZROST	MALDI-TOF/TOF	39	1	6,7	70278	6,32	89723	MAOC_ORYSJ	I1
44	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,59E-04	0,488	0,181	0,37	spadek	MALDI-TOF	136	45	5,14	71371	5,13	92611	2::gi 326519769	H3

45	Niezidentyfikowane		9,25E-04	0,078	0,037	0,47	spadek						6,35	97474		
47	Niezidentyfikowane		8,38E-04		0,095		WZROST						5,47	13580		
48	Niezidentyfikowane		4,75E-04		0,12		WZROST						5,88	14059		
49	Niezidentyfikowane		2,31E-04		0,061		WZROST						4,68	14681		
50	Niezidentyfikowane		3,51E-05		0,076		WZROST						5,44	15837		
52	Uniwerslane białko stresu 23267	<i>Hordeum vulgare</i>	5,63E-03		0,026		WZROST	MALDI-TOF	61	52	6,3	17549	6,72	19079	2::gi 283970966	
54	Niezidentyfikowane		1,19E-04		0,081		WZROST						5,86	20715		K4
57	Białko z rodziny hydrolaz laktonu	<i>Hordeum vulgare</i>	2,21E-04		0,077		WZROST	MALDI-TOF	70	34	5,06	25545	4,95	30855	2::gi 326491903	
58	Niezidentyfikowane		1,40E-05		0,042		WZROST						6,61	32352		
66	Niezidentyfikowane		9,81E-06		0,044		WZROST						6,4	37623		
67	Esteraza	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,43E-04		0,037		WZROST	MALDI-TOF/TOF	35	2	7,88	39563	6,27	38524	GDL62_ARATH	
69	Niezidentyfikowane		1,28E-03		0,026		WZROST						6,52	40154		
70	Niezidentyfikowane		4,65E-03		0,228		WZROST						6,77	41177		B1
71	Białko związane z dojrzewaniem nasion	<i>Hordeum vulgare</i>	1,94E-03		0,098		WZROST	MALDI-TOF	60	29	4,27	26900	4,03	40873	2::gi 326512936	
73	Zależna odATP helikaza RNA z motywem DEAD-box	<i>Oryza sativa japonica</i>	2,83E-04		0,105		WZROST	MALDI-TOF	81	53	7,85	9299	6,49	46090	2::gi 297610438	
74	Beta-glukozydaza 25	<i>Hordeum vulgare</i>	1,18E-07		0,029		WZROST	MALDI-TOF	163	46	5,71	35765	6,03	46392	2::gi 326517467	
75	Niezidentyfikowane		4,28E-04		0,102		WZROST						6,78	52978		
76	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka alfa, mitochondrialna	<i>Brachypodium distachyon</i>	7,72E-04		0,096		WZROST	MALDI-TOF	89	48	8,07	43666	5,75	52748	2::gi 326506962	A3
77	Peroksydaza chrzanowa	<i>Hordeum vulgare</i>	5,87E-04		0,051		WZROST	MALDI-TOF	86	29	6,31	36229	6,58	53093	2::gi 326513264	
80	Niezidentyfikowane		2,73E-08		0,088		WZROST						4,87	60104		
81	Niezidentyfikowane		1,04E-05		0,055		WZROST						6,14	65144		
82	Białko bogate w powtórzenia ankirynowe	<i>Hordeum vulgare</i>	5,36E-07		0,053		WZROST	MALDI-TOF	80	35	4,58	39949	4,48	65857	2::gi 326520599	
84	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, cytoplazmatyczna	<i>Hordeum vulgare</i>	8,10E-04		0,033		WZROST	MALDI-TOF	76	27	6,27	58066	6,46	81191	2::gi 259166850	
85	Dekarboksylaza pirogronianowa, izoforma 1	<i>Zea mays</i>	1,91E-05		0,042		WZROST	MALDI-TOF/TOF	48	1	6,47	66355	6,16	83805	PDC1_MAIZE	K2
86	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Zea mays</i>	7,99E-05		0,335		WZROST	MALDI-TOF/TOF	224	5	5,22	70871	5,16	94204	HSP70_MAIZE	
89	Niezidentyfikowane		3,30E-02	0,028	0		spadek						5,65	15265		
91	Niezidentyfikowane		1,59E-02	0,04	0		spadek						4,97	30312		
92	Niezidentyfikowane		1,51E-06	0,04	0		spadek						5,4	34172		
93	Niezidentyfikowane		7,80E-03	0,047	0		spadek						6,2	42101		
94	Niezidentyfikowane		2,37E-05	0,125	0		spadek						4,82	47619		
95	Niezidentyfikowane		1,37E-02	0,045	0		spadek						4,85	69635		
96	Liaza laktoglutationowa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,15E-02	0,498	0,687	1,38	WZROST	MALDI-TOF/TOF	55	3	7,7	39427	5,31	40572	LGUC_ARATH	K5
97	Białko szoku chłodu (CSP)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,30E-02	0,125	0,168	1,34	WZROST	MALDI-TOF	124	68	5,94	21903	6,4	25228	2::gi 326523669	
98	Peroksydaza askorbiniowa 2, cytozolowa	<i>Oryza sativa</i>	1,25E-02	0,647	0,476	0,74	spadek	MALDI-TOF	117	52	5,1	27964	6,2	32457	2::gi 15808779	H1
99	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	8,68E-03	0,112	0,174	1,55	WZROST	MALDI-TOF	123	33	5,82	55098	5,89	74589	2::gi 15147873	

Tab.4.2. Białka, które wykazały zmiany poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy w korzeniach linii hodowlanej Cam/B1/CI.

Numer białka	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola (%objętościowy)	Susza (%objętościowy)	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT	% pokrycia sekwencji	pl (teretyczny)	Mw (teoretyczna) Da	pl (eksperymentalny)	Mw (eksperymentalna) Da	Numer identyfikacyjny	Pozycja
1	Niezidentyfikowane		3,94E-02	0,173	0,328	1,89	WZROST						4,39	13757		
2	Niezidentyfikowane		2,00E-03	0,027	0,070	2,56	WZROST						4,64	14491		
3	Białko szoku cieplnego 17.6 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,41E-02	0,041	0,095	2,34	WZROST	MALDI-TOF/TOF	148	15	5.36	17593	5.34	16502	HS17C_ARATH	C1
4	Niezidentyfikowane		6,22E-02	0,038	0,109	2,89	WZROST						5,44	16754		
5	Białko odpowiadające na stres chłodu	<i>Hordeum vulgare</i>	6,22E-03	0,124	0,243	1,95	WZROST	MALDI-TOF	65	46	4.93	17659	4.79	16682	2::gi 10799810	I4
6	Białko z rodziny peroksyredoksyn	<i>Hordeum vulgare</i>	5,34E-03	0,058	0,082	1,42	WZROST	MALDI-TOF	111	54	9.04	24204	4.86	17121	2::gi 326497111	
7	Niezidentyfikowane		1,55E-03	0,102	0,055	0,54	spadek						6,17	17383		
8	Niezidentyfikowane		1,00E-02	0,010	0,071	7,36	WZROST						4,13	19038		
9	Czynnik inicjacji translacji	<i>Secale cereale</i>	1,58E-03	0,194	0,126	0,65	spadek	MALDI-TOF	72	66	5.03	12618	5.74	19162	2::gi 82754830	
10	Niezidentyfikowane		8,25E-04	0,071	0,053	0,74	spadek						5,57	24054		
11	Niezidentyfikowane		3,86E-02	0,040	0,078	1,96	WZROST						4,49	25669		
12	Peroksydaza tioredoksynowa	<i>Hordeum vulgare</i>	5,94E-03	0,062	0,082	1,33	WZROST	MALDI-TOF	90	41	6.33	28441	4.76	25724	2::gi 326496957	
13	Niezidentyfikowane		3,32E-04	0,109	0,072	0,66	spadek						4,93	26805		
14	Fosforybulotransferaza adeninowa	<i>Hordeum vulgare</i>	6,61E-03	0,104	0,077	0,74	spadek	MALDI-TOF	131	55	5.15	19777	4.97	28052	2::gi 19711921	
15	Niezidentyfikowane		1,06E-02	0,055	0,033	0,60	spadek						4,49	27810		
16	Oksydaza szczawianowa 1	<i>Hordeum vulgare</i>	1,55E-02	0,073	0,150	2,05	WZROST	MALDI-TOF/TOF	175	12	5.52	21304	6.16	27511	OXO1_HORVU	
17	Niezidentyfikowane		1,65E-02	0,094	0,063	0,67	spadek						5,20	30044		
18	Niezidentyfikowane		2,50E-02	0,021	0,060	2,82	WZROST						5,16	30357		
19	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	<i>Oryza sativa</i>	1,71E-03	0,628	0,414	0,66	spadek	MALDI-TOF	117	52	5.10	27964	5.03	31501	2::gi 15808779	H1
20	Białko zawierające domenę wiążącą NADP z pofaldowaniem	<i>Hordeum vulgare</i>	1,99E-02	0,283	0,208	0,74	spadek	MALDI-TOF	80	52	4.92	27313	4.92	31642	2::gi 326494234	
21	Niezidentyfikowane		3,14E-02	0,063	0,081	1,28	WZROST						5,58	33029		J4
22	Niezidentyfikowane		2,56E-02	0,059	0,018	0,31	spadek						6,30	34375		
23	Izomeraza izopentyldifosforanowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,23E-02	0,073	0,055	0,75	spadek	MALDI-TOF	135	59	4.99	27252	4.92	35513	2::gi 326508098	
24	Białka z rodziny hydrolaz trifosfonukleozydów zawierających pętle P (P-loop)	<i>Hordeum vulgare</i>	3,97E-02	0,043	0,092	2,15	WZROST	MALDI-TOF	114	40	7.08	38699	6.06	35356	2::gi 326522022	I2
25	Fitepsyna, podjednostka A	<i>Hordeum vulgare</i>	1,31E-02	0,107	0,076	0,71	spadek	MALDI-TOF	112	35	5.28	51932	4.97	36797	2::gi 5822248	
26	Niezidentyfikowane		4,27E-02	0,046	0,098	2,13	WZROST						5,23	38581		
27	O-metylotransferaza kwasu kawowego 1	<i>Zea mays</i>	3,15E-04	0,111	0,070	0,63	spadek	MALDI-TOF/TOF	49	3	5.14	29016	4.98	39638	CAMT1_MAIZE	D6
28	Białko z rodziny TRAPP I	<i>Hordeum vulgare</i>	9,94E-04	0,068	0,055	0,81	spadek		74		4.92	32773	4.87	38983	2::gi 326502724	
29	Liaza laktoglutationowa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,71E-02	0,487	0,567	1,16	WZROST	MALDI-TOF/TOF	55	3	7.7	39427	5.27	39858	LGUC_ARATH	K5
30	Niezidentyfikowane		5,35E-03	0,416	0,857	2,06	WZROST						6,87	39976		
31	Abhydrolaza 3	<i>Hordeum vulgare</i>	7,94E-03	0,153	0,101	0,66	spadek	MALDI-TOF	105	41	5.46	36937	5.49	40213	2::gi 326502616	
32	Aldo-keto reduktaza	<i>Hordeum vulgare</i>	1,32E-02	0,127	0,083	0,65	spadek	MALDI-TOF	80	21	6.19	37380	6.17	40392	2::gi 326514718	
33	Reduktaza izoflawonowa	<i>Hordeum vulgare</i>	3,80E-02	0,085	0,066	0,78	spadek	MALDI-TOF	103	40	6.16	36066	6.24	40392	2::gi 197709162	E4
34	Fruktokinaza	<i>Hordeum vulgare</i>	3,67E-03	0,612	0,276	0,45	spadek	MALDI-TOF	137	48	5.06	35907	5.07	43430	2::gi 326513418	H2
35	Rycyna, podjednostka beta, domena wiążąca węglowodany	<i>Hordeum vulgare</i>	9,95E-06	0,187	0,336	1,79	WZROST	MALDI-TOF	137	38	5.71	35765	6.16	42919	2::gi 326517467	
36	Niezidentyfikowane		1,56E-02	0,042	0,060	1,41	WZROST						6,40	43110		
37	Rycyna, podjednostka beta, domena wiążąca węglowodany	<i>Hordeum vulgare</i>	4,68E-02	0,066	0,132	2,00	WZROST	MALDI-TOF	131	38	5.71	35765	6.07	43110	2::gi 326517467	
38	Niezidentyfikowane		7,64E-03	0,094	0,063	0,67	spadek						5,11	45295		
39	Niezidentyfikowane		7,27E-05	0,318	0,150	0,47	spadek						5,68	45691		
40	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytozolowa	<i>Hordeum vulgare</i>	7,46E-03	1,060	0,676	0,64	spadek	MALDI-TOF	99	45	5.62	35920	5.82	45295	2::gi 326490940	
41	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,37E-02	0,893	0,629	0,70	spadek	MALDI-TOF/TOF	45	4	5.67	39436	4.92	46392	ODPB_ARATH	
42	Niezidentyfikowane		3,62E-02	0,013	0,038	2,97	WZROST						4,51	47619		
43	Niezidentyfikowane		3,86E-05	0,061	0,109	1,77	WZROST						5,23	51054		
44	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	<i>Hordeum vulgare</i>	4,44E-03	0,652	0,331	0,51	spadek	MALDI-TOF/TOF	436	14	5.58	43257	5.91	55940	METK2_HORVU	E1
45	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	<i>Hordeum vulgare</i>	1,29E-02	1,198	0,639	0,53	spadek	MALDI-TOF	126	45	5.51	43138	5.76	55455	1::METK3_HORVU	J1

46	Niezidentyfikowane		7,07E-03	0,023	0,075	3,29	WZROST							5,27	58811		
47	Niezidentyfikowane		1,06E-02	0,032	0,059	1,86	WZROST							4,70	51916		I3
48	Niezidentyfikowane		2,13E-03	0,006	0,042	7,21	WZROST							6,01	60894		
49	Niezidentyfikowane		1,17E-02	0,059	0,108	1,84	WZROST							6,78	62642		
50	Niezidentyfikowane		1,48E-03	0,242	0,098	0,40	spadek							5,04	63880		D5
51	Urydylotransferaza glukozo-1-fosforanu	<i>Hordeum vulgare</i>	3,45E-02	0,546	0,401	0,73	spadek	MALDI-TOF	151	45	5,20	51783	5,17	65286	1::UGPA_HORVU		
52	26S proteaza, podjednostak 6A, homolog	<i>Oryza sativa</i>	8,23E-04	0,097	0,062	0,64	spadek	MALDI-TOF	88	48	5,51	21851	4,74	65428	2::gij17298165		
53	26S proteaza, podjednostak 6A, homolog	<i>Brassica campestris</i>	4,21E-04	0,088	0,032	0,36	spadek	MALDI-TOF	176	38	4,97	48557	4,82	65286	1::PR56A_BRACM		
54	Niezidentyfikowane		1,92E-03	0,468	2,994	6,40	WZROST							6,68	66465		
55	Niezidentyfikowane		2,95E-03	0,250	0,955	3,82	WZROST							6,55	64720		
56	Niezidentyfikowane		2,42E-03	0,154	0,450	2,92	WZROST							6,42	66000		
57	Niezidentyfikowane		4,49E-03	0,077	0,040	0,52	spadek							4,87	69128		
58	Niezidentyfikowane		7,57E-03	0,085	0,043	0,51	spadek							4,75	69128		
59	Niezidentyfikowane		6,74E-03	0,182	0,585	3,22	WZROST							6,47	66322		
60	Niezidentyfikowane		9,46E-04	0,112	0,047	0,41	spadek							6,27	71179		
61	Niezidentyfikowane		8,08E-03	0,159	0,222	1,39	WZROST							6,12	74010		D1
62	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-karboksylanu 12A1, mitochondrialna	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,10E-03	0,061	0,082	1,35	WZROST	MALDI-TOF/TOF	137	6	6,26	62190	6,42	75283	AL121_ARATH	J2	
63	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	1,42E-02	0,087	0,133	1,53	WZROST	MALDI-TOF	123	33	5,82	55098	6,20	74735	2::gij15147873	K6	
64	Niezidentyfikowane		1,32E-02	0,067	0,090	1,33	WZROST							6,31	77140		D3
65	Dekarboksylaza pirogronianowa, izoforma 1	<i>Zea mays</i>	8,98E-04	0,003	0,026	7,77	WZROST	MALDI-TOF/TOF	48	1	6,47	66355	6,16	80208	PDC1_MAIZE	K2	
66	Mutaza bisfosfoglucerynianowa	<i>Zea mays</i>	2,79E-03	0,031	0,098	3,15	WZROST	MALDI-TOF/TOF	61	24	5,39	61316	6,25	85454	PNG1_MESCR	K3	
67	Dehydrogenaza jablczanowa zależna od NADP	<i>Hordeum vulgare</i>	1,18E-02	0,047	0,116	2,47	WZROST	MALDI-TOF	122	26	6,46	68655	5,99	85246	2::gij326530055		
68	Fosfoglukomutaza 1	<i>Hordeum vulgare</i>	6,90E-03	0,171	0,136	0,80	spadek	MALDI-TOF	218	49	5,28	62954	5,49	87137	2::gij326504468	D7	
69	V-tytu ATPaza, podjednostak A	<i>Hordeum vulgare</i>	5,32E-03	0,123	0,094	0,76	spadek	MALDI-TOF	241	52	5,23	68752	5,30	87349	2::gij11527563	D4	
70	Dehydrogenaza jablczanowa zależna od NADP	<i>Oryza sativa</i>	2,09E-02	0,024	0,058	2,35	WZROST	MALDI-TOF/TOF	39	1	6,7	70278	6,32	86292	MAOC_ORYSJ	I1	
71	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Vigna radiata</i>	8,97E-04	0,390	0,198	0,51	spadek	MALDI-TOF	74	26	5,14	71583	5,09	88420	2::gij45331283	H3	
72	Niezidentyfikowane		1,33E-02	0,037	0,178	4,78	WZROST							6,15	93518		
73	Niezidentyfikowane		5,54E-04	0,045	0,108	2,42	WZROST							5,95	90161		
74	Niezidentyfikowane		3,22E-03	0,040	0,069	1,72	WZROST							5,63	92837		
75	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Oryza sativa</i>	2,55E-06	0,265	0,094	0,36	spadek	MALDI-TOF	78	30	5,73	54553	6,25	93518	2::gij1944573	J3	
76	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Spinacia oleracea</i>	8,96E-03	0,112	0,155	1,38	WZROST	MALDI-TOF/TOF	80	2	4,87	64918	4,60	94434	HSP75_SPIOL		
77	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Hordeum vulgare</i>	6,23E-04	0,074	0,036	0,49	spadek	MALDI-TOF	109	32	5,89	76199	6,36	9204	2::gij326526355		
78	Niezidentyfikowane		2,06E-03	0,026	0,084	3,25	WZROST							5,36	95592		
79	Transketolaza	<i>Zea mays</i>	2,62E-03	0,085	0,131	1,54	WZROST	MALDI-TOF/TOF	47	1	5,47	73347	5,49	95359	TKTC_MAIZE		
80	Transketolaza	<i>Zea mays</i>	1,62E-02	0,045	0,080	1,77	WZROST	MALDI-TOF/TOF	49	1	5,47	73347	5,42	95825	TKTC_MAIZE		
82	Kazeino-lityczna proteaza serynowa	<i>Brachypodium distachyon</i>	3,28E-03	0,043	0,063	1,46	WZROST	MALDI-TOF	113	17	5,95	97689	5,59	103345	2::gij357149201		
83	Lipoksygenaza	<i>Hordeum vulgare</i>	3,96E-03	0,122	0,170	1,40	WZROST	MALDI-TOF	91	17	5,73	96447	6,17	104104	1::LOX1_HORVU		
84	Niezidentyfikowane		1,29E-04	0,171	0,757	4,42	WZROST							6,61	65002		
85	Niezidentyfikowane		1,17E-02	0,514	0,319	0,62	spadek							5,03	87990		
86	V-tytu ATPaza	<i>Hordeum vulgare</i>	1,84E-03	0,361	0,210	0,58	spadek	MALDI-TOF	124	32	5,54	73034	6,03	99393	2::gij326514246		
87	Białko szoku cieplnego 16,9 kDa	<i>Hordeum vulgare</i>	3,30E-02	0,164	0,570	3,47	WZROST	MALDI-TOF	89	49	5,83	16917	5,77	15298	2::gij326490111	K8	
88	Niezidentyfikowane		5,30E-03	0,115	0,087	0,76	spadek							5,16	36960		
89	Niezidentyfikowane		2,96E-02	0,096	0,067	0,70	spadek							5,31	27273		
90	Transferaza S-glutationowa	<i>Hordeum vulgare</i>	5,81E-03	0,071	0,032	0,45	spadek	MALDI-TOF	80	29	5,41	25132	5,68	32018	2::gij326501538		
91	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Oryza sativa</i>	9,64E-04	0,076	0,033	0,44	spadek	MALDI-TOF/TOF	109	3	6,07	76021	6,13	94665	PAL1_ORYSJ	E3	
92	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,94E-02	0,041	0,094	2,27	WZROST	MALDI-TOF	113	34	5,14	71620	4,97	87900	2::gij224098390		
94	Niezidentyfikowane		2,65E-03		0,054		WZROST							5,83	20537		K4
95	Niezidentyfikowane		8,05E-06		0,080		WZROST							5,72	28358		
96	Aldolaza 2-hydro-3-deoksyfosfoheptonowa	<i>Morinda citrifolia</i>	1,24E-06		0,029		WZROST	MALDI-TOF	73	35	7,28	59529	6,67	35251	2::gij2546988		
97	Niezidentyfikowane		3,83E-03		0,020		WZROST							6,41	36906		E2
99	Niezidentyfikowane		2,28E-03		0,048		WZROST							6,74	74917		
100	Dehydrogenaza semialdehydu aminoadypinowego	<i>Hordeum vulgare</i>	2,69E-06		0,024		WZROST	MALDI-TOF	96	32	5,77	55081	6,09	77517	2::gij326510533		
101	Niezidentyfikowane		6,28E-03		0,049		WZROST							6,32	91267		
102	Niezidentyfikowane		3,62E-04	0,049		0,00	spadek							5,69	15397		
103	Niezidentyfikowane		2,34E-03	0,022		0,00	spadek							5,65	28978		
104	O-metylotransferaza flawonoidowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,14E-04	0,030		0,00	spadek	MALDI-TOF	116	34	5,64	38982	5,90	44933	2::gij148337324		
105	Niezidentyfikowane		1,53E-03	0,062	0,013	0,21	spadek							4,90	79623		
106	Fruktokinaza	<i>Hordeum vulgare</i>	1,61E-03		0,122	0,00	spadek	MALDI-TOF	152	58	5,67	34933	5,57	81588	2::gij326489677		
107	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	<i>Oryza sativa</i>	2,56E-02	0,518	0,371	0,72	spadek	MALDI-TOF/TOF	57	8	5,97	25432	5,56	45689	SODM3_MAIZE	K7	

Tab. 4.3. Białka, które wykazały zmiany poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy w korzeniach odmiany Stratus

Numer białka	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola (%objętościowy)	Susza (%objętościowy)	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT	% pokrycia sekwencji	pl (teretyczny)	Mw (teoretyczna) Da	pl (eksperymentalny)	Mw (eksperymentalna) Da	Numer identyfikacyjny	Pozycja
1	Niezidentyfikowane		7,49E-03	0,214	0,127	0,60	spadek						6.31	14120		F1
2	Niezidentyfikowane		3,88E-02	0,223	0,174	0,78	spadek						5.79	15498		
3	Niezidentyfikowane		1,51E-02	0,339	0,412	1,21	WZROST						6.40	19967		
4	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	<i>Triticum aestivum</i>	2,95E-02	0,109	0,532	4,88	WZROST	MALDI-TOF/TOF	106	15	5.80	16868	5.59	16927	HS16A_WHEAT	K8
5	Niezidentyfikowane		1,69E-01	0,042	0,028	0,66	spadek						6.23	18792		
6	Niezidentyfikowane		2,65E-02	0,083	0,026	0,32	spadek						5.30	21169		
7	Niezidentyfikowane		1,12E-03	0,020	0,077	3,82	WZROST						5.64	21963		K4
8	Niezidentyfikowane		1,48E-04	0,046		0,00	spadek						4.42	31408		
9	Niezidentyfikowane		2,44E-02	0,095	0,191	2,01	WZROST						6.39	29167		A1
10	Germina 8-5	<i>Oryza sativa</i>	9,97E-03	0,206	0,102	0,49	spadek	MALDI-TOF/TOF	120	7	6.40	24400	6.56	29677	GL85_ORYSJ	G1
11	Niezidentyfikowane		3,50E-02	0,101	0,074	0,73	spadek						6.34	31455		
12	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	<i>Oryza sativa</i>	3,33E-02	0,505	0,397	0,78	spadek	MALDI-TOF/TOF	165	9	5.10	27215	5.01	33225	APX2_ORYSJ	H1
13	Niezidentyfikowane		8,89E-03	0,018	0,051	2,79	WZROST						5.43	34122		F3
14	Niezidentyfikowane		1,72E-02	0,043	0,062	1,43	WZROST						5.49	34021		J4
15	Niezidentyfikowane		1,23E-02	0,050	0,034	0,69	spadek						5.07	35565		
16	Niezidentyfikowane		3,00E-05	0,044		0,00	spadek									
17	Niezidentyfikowane		2,53E-02	0,040	0,059	1,46	WZROST						6.10	37511		
18	Białko z rodziny 14-3-3 (GF14-6)	<i>Zea mays</i>	8,79E-03	0,097	0,064	0,66	spadek	MALDI-TOF/TOF	213	11	4.60	29758	4.54	38868	14331_MAIZE	
19	Białko z rodziny 14-3-3 (GF14-6)	<i>Zea mays</i>	2,32E-02	0,154	0,126	0,82	spadek	MALDI-TOF/TOF	215	11	4.60	29758	4.60	38753	14331_MAIZE	
20	Białko z rodziny 14-3-3 (GF14-6)	<i>Zea mays</i>	3,29E-04	0,033	0,048	1,42	WZROST	MALDI-TOF/TOF	215	11	4.60	29758	5.66	37990	14331_MAIZE	F4
21	Niezidentyfikowane		4,79E-03	0,039	0,018	0,47	spadek						5.22	38410		
22	Niezidentyfikowane		3,14E-02	0,048	0,026	0,53	spadek						5.44	38297		
23	O-metylotransferaza kwasu kawowego 1	<i>Zea mays</i>	1,08E-02	0,096	0,065	0,67	spadek	MALDI-TOF/TOF	49	3	5.14	29016	4.98	40392	CAMT1_MAIZE	D6
24	Liaza laktoglutationowa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,11E-02	0,405	0,537	1,33	WZROST	MALDI-TOF/TOF	55	3	7.7	39427	5.27	39858	LGUC_ARATH	K5
25	Białko wiążące nukleotyd guaninowy	<i>Oryza sativa</i>	1,04E-02	0,152	0,122	0,80	spadek	MALDI-TOF/TOF	85	3	6.0	36665	6.32	42476	GBLPA_ORYSJ	
26	Fruktokinaza 2	<i>Oryza sativa</i>	2,90E-04	0,957	0,459	0,48	spadek	MALDI-TOF/TOF	58	20	4.9	35893	5.08	44602	2::gi 326513418	H2
27	Fruktokinaza 2	<i>Oryza sativa</i>	4,45E-04	0,301	0,156	0,52	spadek	MALDI-TOF/TOF	74	8	4.9	35893	4.96	45393	SCRK2_ORYSI	
28	Niezidentyfikowane		7,04E-02	0,195	0,397	2,04	WZROST						5.98	48456		
29	Niezidentyfikowane		5,80E-04	0,136	0,057	0,42	spadek						5.20	45000		
30	Niezidentyfikowane		6,70E-03	0,060	0,024	0,40	spadek						6.53	45990		
31	Beta-glukozydaza	<i>Oryza sativa</i>	1,01E-02	0,073	0,033	0,46	spadek	MALDI-TOF/TOF	47	2	5.5	57440	6.14	48773	BGI25_ORYSJ	
32	Aldolaza fruktozo-bisfosforanu	<i>Zea mays</i>	2,66E-02	0,208	0,145	0,70	spadek	MALDI-TOF/TOF	87	3	8.6	39036	6.43	48667	ALF_MAIZE	
33	Niezidentyfikowane		3,73E-03	0,182	0,093	0,51	spadek						5.42	47723		
34	Niezidentyfikowane		1,64E-02	0,184	0,103	0,56	spadek						6.12	57500		F5
35	Niezidentyfikowane		1,66E-02	0,497	0,317	0,64	spadek						5.69	51165		
36	Niezidentyfikowane		1,42E-02	0,141	0,079	0,56	spadek						5.60	50173		
37	Niezidentyfikowane		7,12E-03	0,068	0,087	1,27	WZROST						6.18	55697		
38	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Brachypodium distachyon</i>	3,38E-02	0,167	0,215	1,28	WZROST	MALDI-TOF	89	48	8.07	43666	5.68	56379	2::gi 326506962	A3
39	Dehydrogenaza mrówczanowa	<i>Hordeum vulgare</i>	2,93E-02	0,083	0,148	1,78	WZROST	MALDI-TOF/TOF	90	29	7.1	41747	6.78	52862	FDH_HORVU	F2
40	Niezidentyfikowane		9,46E-03	0,542	0,433	0,80	spadek						5.34	55334		
41	Syntaza S-adenozylometioninowa 3	<i>Hordeum vulgare</i>	6,76E-03	0,746	0,483	0,65	spadek	MALDI-TOF/TOF	102	33	5.4	43138	5.69	59843	METK3_HORVU	J1
42	Niezidentyfikowane		5,53E-03	0,133	0,075	0,56	spadek						5.79	62778		
43	Niezidentyfikowane		1,20E-02	0,077	0,038	0,49	spadek						5.54	65002		
44	Niezidentyfikowane		1,02E-03	0,401	0,217	0,54	spadek						5.07	65571		D5
45	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Hordeum vulgare</i>	4,07E-02	0,082	0,056	0,67	spadek	MALDI-TOF/TOF	48	66	7.8	6430	5.27	67959	ATP5B_HORVU	A4
46	Niezidentyfikowane		2,70E-03	0,066	0,085	1,28	WZROST						5.77	69975		
47	Niezidentyfikowane		1,30E-02	0,095	0,039	0,41	spadek						6.23	75467		
48	Niezidentyfikowane		1,06E-04	0,031	0,011	0,35	spadek						5.30	76392		

49	Niezidentyfikowane		4,63E-03	0,185	0,220	1,19	WZROST						6,08	76578		D1
50	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu 12A1, mitochondrialna	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,95E-02	0,062	0,086	1,37	WZROST	MALDI-TOF/TOF	137	6	6,26	62190	6,39	78277	AL121_ARATH	J2
51	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	1,19E-03	0,091	0,161	1,76	WZROST	MALDI-TOF	123	33	5,82	55098	6,18	78086	2::gil15147873	K6
52	Niezidentyfikowane		1,40E-02	0,088	0,123	1,39	WZROST						6,29	79430		D3
53	Dekarboksylaza pirogrnonianowa 1	<i>Zea mays</i>	2,34E-04	0,014	0,032	2,32	WZROST	MALDI-TOF/TOF	48	1	6,47	66355	6,12	82588	PDC1_MAIZE	K2
54	Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego, mitochondrialna	<i>A. thaliana</i>	4,36E-02	0,113	0,123	1,09	WZROST	MALDI-TOF/TOF	70	2	5,8	70240	6,08	84214	DHSA1_ARATH	
55	Niezidentyfikowane		2,19E-03	0,103	0,066	0,64	spadek						5,93	65039		F6
56	Niezidentyfikowane		2,05E-03	0,080	0,267	3,36	WZROST						6,46	85039		A2
57	Mutaza bisfosfoglicynianowa	<i>Zea mays</i>	8,79E-04	0,025	0,136	5,45	WZROST	MALDI-TOF/TOF	61	24	5,39	61316	6,21	86082	PNGI_MESCR	K3
58	Niezidentyfikowane		8,60E-03	0,076	0,054	0,71	spadek						5,43	87990		
59	V-tytu ATPaza, podjednostka A	<i>Hordeum vulgare</i>	3,14E-02	0,094	0,077	0,82	spadek	MALDI-TOF/TOF	73	3	5,0	69111	5,35	88636	VATA_ARATH	D4
60	V-tytu ATPaza, podjednostka A	<i>Hordeum vulgare</i>	1,85E-03	0,304	0,217	0,71	spadek	MALDI-TOF/TOF	156	3	5,3	64400	5,31	88636	VATA_HORVU	
61	Fosfoglukomutaza 1	<i>Hordeum vulgare</i>	7,65E-03	0,168	0,125	0,74	spadek	MALDI-TOF	218	49	5,28	62954	5,51	87563	2::gil326504468	D7
62	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,92E-03	0,486	0,305	0,63	spadek	MALDI-TOF/TOF	253	5	4,9	71712	5,14	91044	HSP70_ARATH	H3
63	Niezidentyfikowane		1,11E-04	0,019		0,00	spadek						6,75	90602		
64	Niezidentyfikowane		3,00E-02	0,083	0,039	0,47	spadek						6,52	89942		
65	Niezidentyfikowane		9,12E-09	0,026		0,00	spadek						5,89	89287		
66	Niezidentyfikowane		7,59E-02	0,024	0,033	1,33	WZROST						5,79	91489		
67	Amoniakoliza fenoloalaniny	<i>Oryza sativa</i>	1,54E-02	0,259	0,097	0,37	spadek	MALDI-TOF	78	30	5,73	54553	6,23	93063	2::gil1944573	J3
68	Niezidentyfikowane		4,21E-03	0,082	0,066	0,81	spadek						5,31	96764		
69	Niezidentyfikowane		4,30E-03	0,240	0,112	0,47	spadek						6,53	96293		
70	Niezidentyfikowane		5,71E-03	0,141	0,053	0,37	spadek						6,87	102343		
71	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	<i>Zea mays</i>	4,23E-03	0,368	0,199	0,54	spadek	MALDI-TOF/TOF	57	8	5,97	25432	5,49	44933	SODM3_MAIZE	K7
72	Niezidentyfikowane		6,54E-03	0,099	0,014	0,14	spadek						6,19	101597		
73	Niezidentyfikowane		5,99E-04	0,224	0,109	0,49	spadek						6,40	43174		
74	Niezidentyfikowane		2,89E-02	0,024	0,050	2,09	WZROST						5,62	93518		
75	Niezidentyfikowane		6,32E-03	0,033	0,016	0,47	spadek						5,25	42539		
76	Niezidentyfikowane		3,98E-03	0,019	0,053	2,78	WZROST						5,66	62099		
77	Niezidentyfikowane		4,89E-03		0,084		WZROST						6,00	12346		
79	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Zea mays</i>	2,64E-02	0,182	0,375	2,06	WZROST	MALDI-TOF/TOF	224	5	5,22	70871	5,67	67093	HSP70_MAIZE	

Tab. 4.4. Białka, które wykazały zmiany poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy w korzeniach odmiany Sebastian.

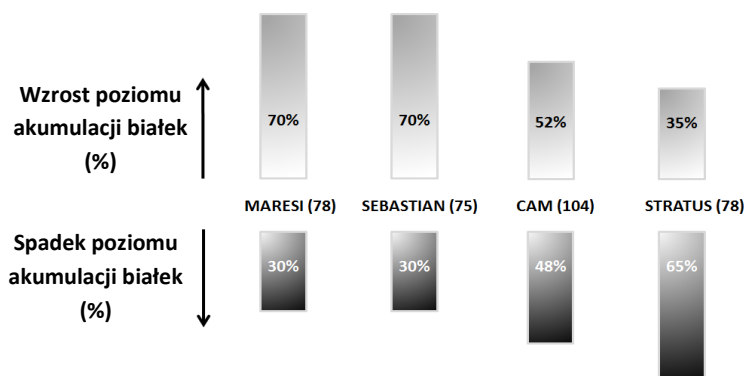
Numer białka	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola (%objętościowy)	Susza (%objętościowy)	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT	% pokrycia sekwencji	pl (teretyczny)	Mw (teoretyczna) Da	pl (eksperymentalny) Da	Mw (eksperymentalna) Da	Numer identyfikacyjny	Pozycja
1	Syntaza kalozy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,65E-03	0,248	0,373	1,50	WZROST	MALDI-TOF/TOF	100	6	5.3	20060	5.08	13639	GRP1_ARATH	
2	Niezidentyfikowane		3,31E-02	0,389	0,194	0,50	spadek						6.33	14460		F1
3	Niezidentyfikowane		7,64E-05	0,046	0,101	2,21	WZROST						6.11	15769		B2
4	Niezidentyfikowane		2,57E-02	0,388	0,310	0,80	spadek						5.14	16395		
5	Niezidentyfikowane		4,09E-02	0,028	0,058	2,06	WZROST						5.28	18670		
6	Niezidentyfikowane		7,15E-04	0,135	0,268	1,99	WZROST						5.92	20492		
7	Niezidentyfikowane		1,37E-02	0,039	0,073	1,87	WZROST						5.65	22010		K4
8	Niezidentyfikowane		1,89E-04	0,050	0,122	2,44	WZROST						4.98	26747		
9	Niezidentyfikowane		1,46E-02	0,567	0,802	1,41	WZROST						5.71	28916		
14	Germina 8-5	<i>Oryza sativa</i>	7,77E-06	0,302	0,142	0,47	spadek	MALDI-TOF/TOF	120	7	6,4	24400	6,73	28666	GL85_ORYSJ	G1
11	Niezidentyfikowane		3,37E-02	0,046	0,059	1,30	WZROST						5.50	34223		J4
12	Białko z rodziny 14-3-3	<i>Hordeum vulgare</i>	8,40E-04	0,029	0,038	1,35	WZROST	MALDI-TOF/TOF	71	3	7.7	39427	5.69	37958	1433A_HORVU	F4
13	Liaza laktoglutationowa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,13E-03	0,247	0,535	2,17	WZROST	MALDI-TOF/TOF	55	3	7.7	39427	5.27	39858	LGUC_ARATH	K5
14	Niezidentyfikowane		8,47E-04	0,355	1,030	2,90	WZROST						6.77	40273		
15	Niezidentyfikowane		3,32E-03	0,077	0,168	2,17	WZROST						6.63	41055		B1
16	Niezidentyfikowane		1,04E-02	0,079	0,149	1,88	WZROST						6.51	41791		
17	Reduktaza izoflawonowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,33E-02	0,049	0,055	1,12	WZROST	MALDI-TOF/TOF	66	3	9.5	35860	6.14	43688	2::gi 197709162	E4
18	Niezidentyfikowane		2,17E-03	0,031	0,019	0,62	spadek						6.11	44273		
19	Dehydrogenaza jablczanowa, mitochondrialna	<i>Brassica napus</i>	1,52E-01	0,391	0,278	0,71	spadek	MALDI-TOF	86	45	6.0	45673	6.65	43688		
20	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	<i>Brachypodium distachyon</i>	4,33E-04	0,148	0,427	2,89	WZROST	MALDI-TOF	89	48	8.07	43666	5.98	48667	2::gi 326506962	
21	Niezidentyfikowane		3,73E-03	0,114	0,064	0,56	spadek						6.12	51500		F5
22	Niezidentyfikowane		5,31E-05	0,269	0,133	0,49	spadek						5.63	49955		
23	Niezidentyfikowane		5,24E-02	0,233	0,187	0,80	spadek						5.58	51165		
24	Niezidentyfikowane		3,60E-05	0,149	0,042	0,28	spadek						6.14	54498		
25	Niezidentyfikowane		8,43E-03	0,033	0,017	0,53	spadek						6.76	51165		
26	Niezidentyfikowane		9,30E-04	0,329	0,227	0,69	spadek						5.79	56184		
27	Dehydrogenaza mrowczanowa, mitochondrialna	<i>Daucus carota</i>	1,68E-02	0,095	0,147	1,55	WZROST	MALDI-TOF/TOF	115	4	7.2	52908	6.77	53209	CISY_DAUCA	F2
28	Czynnik elongacyjny Tu, mitochondrialny	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,61E-02	0,064	0,094	1,47	WZROST	MALDI-TOF/TOF	65	2	6.3	49607	5.97	57796	EFTM_ARATH	
29	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	<i>Hordeum vulgare</i>	1,52E-02	0,774	0,526	0,68	spadek	MALDI-TOF/TOF	98	9	5.6	43247	5.70	60235	METK3_HORVU	J1
30	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	<i>Hordeum vulgare</i>	1,62E-03	0,532	0,325	0,61	spadek	MALDI-TOF/TOF	436	14	5.58	43257	5.83	61829	METK2_HORVU	E1
31	Niezidentyfikowane		3,22E-06	0,067	0,166	2,49	WZROST						5.56	67959		
32	Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego, mitochondrialna	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-02	0,073	0,139	1,91	WZROST	MALDI-TOF/TOF	125	3	9.1	56457	6.16	71179	SSDH_ORYSJ	
33	Niezidentyfikowane	<i>Hordeum vulgare</i>	2,95E-03	0,117	0,057	0,49	spadek						6.21	75283	RBB_HORVU	
34	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu, mitochondrialna	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,49E-02	0,055	0,089	1,62	WZROST	MALDI-TOF/TOF	137	6	6.26	62190	6.38	78086	AL121_ARATH	J2
35	Niezidentyfikowane		7,64E-05	0,118	0,059	0,50	spadek						5.92	85454		F6
36	Mutaza bisfosfoglucerynianowa	<i>Oryza sativa</i>	2,03E-04	0,033	0,132	3,98	WZROST	MALDI-TOF/TOF	61	24	5.39	61316	6.19	86502	PNGI_MESCR	K3
37	Niezidentyfikowane		8,41E-06	0,022		0,00	spadek						6.72	91044		
38	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Oryza sativa</i>	8,26E-04	0,329	0,121	0,37	spadek	MALDI-TOF	78	30	5.73	54553	6.21	93063	2::gi 1944573	J3
39	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	<i>Zea mays</i>	2,75E-05	0,310	0,149	0,48	spadek	MALDI-TOF/TOF	57	8	5.97	25432	5.50	45295	SODM3_MAIZE	K7
40	Niezidentyfikowane		1,68E-03	0,034	0,018	0,53	spadek						5.73	63742		
41	Niezidentyfikowane		3,10E-02	0,027	0,041	1,53	WZROST						6.32	84419		
42	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Oryza sativa</i>	8,92E-04	0,060	0,020	0,34	spadek	MALDI-TOF/TOF	109	3	6.07	76021	6.10	93746	PAL1_ORYSJ	E3
43	Niezidentyfikowane		4,09E-04	0,130	0,074	0,56	spadek						6.32	44012		
44	Niezidentyfikowane		1,78E-03	0,021	0,057	2,68	WZROST						4.69	61964		
45	Niezidentyfikowane		6,52E-04	0,023	0,047	2,08	WZROST						4.74	61695		I3

46	Niezidentyfikowane		9,73E-04	0,058	0,102	1,75	WZROST						5,81	14745		
47	Niezidentyfikowane		1,96E-03	0,011	0,050	4,52	WZROST						5,04	18549		
48	Niezidentyfikowane		5,88E-04	0,060	0,173	2,88	WZROST						4,80	18833		
49	Niezidentyfikowane		1,85E-04	0,040	0,197	4,91	WZROST						4,45	19203		
50	Białko regulowane stresem chłodu	<i>Hordeum vulgare</i>	1,29E-04	0,034	0,159	4,66	WZROST	MALDI-TOF	65	46	4,93	17659	4,62	18914	2::gi 10799810	I4
51	Niezidentyfikowane		6,05E-03	0,067	0,196	2,94	WZROST						4,73	19752		
52	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	<i>Brachypodium distachyon</i>	2,73E-03	0,021	0,047	7,72	WZROST	MALDI-TOF	86	29	5,78	20173	6,18	23235	2::gi 357137226	B3
53	Niezidentyfikowane		2,38E-04	0,013	0,035	2,66	WZROST						5,44	34122		F3
54	Białka z rodziny hydrolaz trifosfonukleozydów zawierających pętle P (P-loop)	<i>Hordeum vulgare</i>	4,44E-06	0,011	0,185	16,34	WZROST	MALDI-TOF	114	40	7,08	38699	5,98	38410	2::gi 326522022	I2
55	Niezidentyfikowane		5,83E-04	0,022	0,063	2,81	WZROST						5,80	48561		
56	Niezidentyfikowane		7,55E-03	0,070	0,164	2,34	WZROST						6,27	72052		
57	Dekarboksylaza pirogronianowa 1	<i>Zea mays</i>	1,29E-03	0,011	0,035	3,29	WZROST	MALDI-TOF/TOF	48	1	6,47	66355	6,11	82790	PDC1_MAIZE	K2
58	Niezidentyfikowane		6,76E-03	0,023	0,035	1,51	WZROST						5,06	21032		
59	Niezidentyfikowane		1,29E-06		0,108		WZROST						4,19	19624		
60	Niezidentyfikowane		1,48E-04		0,096		WZROST						4,32	19539		
61	Niezidentyfikowane		4,78E-03		0,186		WZROST						5,12	19038		
62	Niezidentyfikowane		4,66E-04		0,044		WZROST						4,23	20448		
63	Niezidentyfikowane		1,15E-05		0,041		WZROST						5,58	32592		
64	Niezidentyfikowane		1,16E-04		0,038		WZROST						6,28	39564		E2
65	Niezidentyfikowane		4,32E-06		0,107		WZROST						4,01	44273		
66	Niezidentyfikowane		1,95E-05		0,114		WZROST						6,18	54735		
67	Niezidentyfikowane		1,24E-04		0,061		WZROST						6,69	52748		
68	Niezidentyfikowane		2,41E-07		0,055		WZROST						6,61	64020		
69	Niezidentyfikowane		3,38E-06		0,028		WZROST						5,41	65857		
70	Dehydrogenaza jablczanowa zależna od NADP	<i>Oryza sativa</i>	1,15E-06		0,141		WZROST	MALDI-TOF/TOF	39	1	6,7	70278	6,29	86082	MAOC_ORYSJ	I1
71	Niezidentyfikowane		5,58E-06	0,069		0,00	spadek						6,03	45890		
72	Niezidentyfikowane		2,70E-02	0,018	0,051	2,87	WZROST						6,98	46701		
73	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	1,65E-01	0,103	0,165	1,60	WZROST	MALDI-TOF	123	33	5,82	55098	5,78	76021	2::gi 15147873	K6
74	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	2,57E-03	0,031	0,080	2,56	WZROST	MALDI-TOF	132	37	5,47	55276	5,45	78065	2::gi 15147871	
75	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	<i>Triticum aestivum</i>	5,42E-03	0,037	0,145	3,88	WZROST	MALDI-TOF/TOF	106	15	5,80	16868	5,11	17092	HS16A_WHEAT	K8

Największą liczbą białek, których poziom akumulacji zmienił się w warunkach stresu suszy, charakteryzowały się korzenie linii Cam/B1/CI – 104 białka różnicujące. U odmian Maresi i Stratus znaleziono po 78 takich białek, natomiast u odmiany Sebastian wykryto 75 białek różnicujących. W korzeniach odmiany Maresi wykryto 24 białka, które uległy ekspresji tylko w przypadku roślin wzrastających w warunkach suszy. Wśród białek różnicujących korzenie kontrolne od korzeni poddanych niedoborowi wody u odmian Maresi i Sebastian znaczącą większość stanowiły te, które w odpowiedzi na stres wykazały podwyższony poziom akumulacji. U odmiany Stratus zaobserwowano odwrotną tendencję, i przeważająca liczba białek różnicujących posiadała obniżony poziom akumulacji. Dla linii hodowlanej Cam/B1/CI liczba białek wykazujących wzrost w profilu akumulacji w niewielkim stopniu przewyższała liczbę białek o obniżonym poziomie ekspresji (Tab. 4.5; Ryc. 4.4).

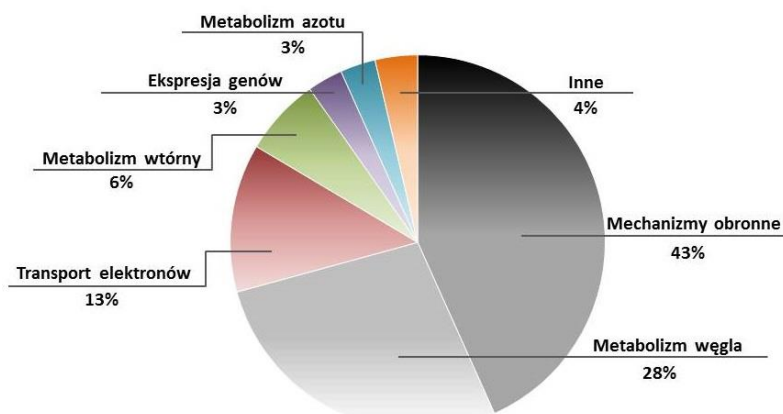
Tab. 4.5. Porównanie czterech badanych genotypów jęczmienia pod względem liczby białek reagujących zmianą poziomu akumulacji na niedobór wody.

	Genotyp			
	MARESI	CAM/B1/CI	STRATUS	SEBASTIAN
Białka odpowiadające zmianą poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy	78	104	78	75
Białka zidentyfikowane	45	61	31	26
Wzrost poziomu akumulacji	55	55	27	53
Spadek poziomu akumulacji	23	49	51	22
Białka wykryte wyłącznie w korzeniach roślin poddanych suszy	24	7	1	12
Białka wykryte wyłącznie w korzeniach roślin kontrolnych	6	4	4	2



Ryc. 4.4. Zróznicowanie badanych linii jęczmienia pod względem procentowego udziału białek wykazujących wzrost i spadek poziomu akumulacji w warunkach niedoboru wody w porównaniu do warunków kontrolnych.

Wszystkie zidentyfikowane białka zostały pogrupowane w zależności od pełnionych funkcji biologicznych (Ryc. 4.5). Wśród zidentyfikowanych białek najliczniejszą grupę stanowiły białka pełniące funkcje obronne (43%) m.in. białka szoku cieplnego, białka związane z osmoregulacją oraz zaangażowane w usuwanie wolnych rodników. Białka te wykazały najsilniejszy wzrost poziomu akumulacji w korzeniach roślin wzrastających w warunkach niedoboru wody w porównaniu do roślin kontrolnych. Podobny profil zmian akumulacji charakteryzował białka, których funkcje związane są z metabolizmem węgla (28%). Z kolei białka, których poziom akumulacji spadał w warunkach niedoboru wody były związane z metabolizmem wtórnym (6%) oraz metabolizmem azotu (3%). Pozostałe grupy funkcyjne: transport elektronów (13%), regulacja ekspresji genów (3%), inne (4%) wykazały podobny poziom wzrostu i spadku w profilach akumulacji białek (Ryc. 4.5; Tab. 4.6).



Ryc. 4.5. Procentowy podział białek odpowiadających na stres suszy z uwzględnieniem funkcji biologicznych pełnionych w komórkach roślinnych.

Tab. 4.6. Liczba białek zidentyfikowanych w korzeniach czterech genotypów jęczmienia, z podziałem na funkcje biologiczne oraz uwzględnieniem wzrostu (↑) i spadku (↓) poziomu akumulacji.

Funkcje biologiczne	Genotyp							
	MARESI		CAM/B1/CI		STRATUS		SEBASTIAN	
Mechanizmy obronne (71)	17↑	7↓	11↑	11↓	6↑	7↓	11↑	1↓
Metabolizm węgla (45)	7↑	3↓	14↑	7↓	4↑	5↓	4↑	1↓
Transport elektronów (21)	4↑	1↓	3↑	4↓	2↑	3↓	3↑	1↓
Metabolizm azotu (5)	-	-	-	2↓	-	1↓	-	2↓
Metabolizm wtórny (11)	-	-	-	6↓	-	2↓	1↑	2↓
Regulacja ekspresji genów (5)	2↑	-	-	1↓	-	1↓	1↑	-
Inne (6)	2↑	1↓	1↑	2↓	-	-	-	-
Razem (163)	32↑	12↓	29↑	32↓	12↑	19↓	19↑	8↓

W grupie białek pełniących funkcje obronne, których poziom akumulacji uległ zmianie w warunkach suszy we wszystkich badanych odmianach jęczmienia zidentyfikowano białko szoku cieplnego. Białko szoku cieplnego o masie 16.9 kDa (sHSP16.9) charakteryzowało się większym aniżeli 3-krotnym, w stosunku do kontroli, wzrostem poziomu akumulacji dla wszystkich analizowanych genotypów. U odmiany Maresi (nr białek wg Tab. 4.1: 3,5,6) zanotowano ponad 10-krotny, u odmiany Stratus (nr białka wg Tab. 4.3: 4) 5-krotny, natomiast linia hodowlana Cam/B1/CI (nr białek wg Tab. 4.2: 3,87) i Sebastian (nr białka wg Tab. 4.4: 75) wykazały 4-krotny wzrost poziomu akumulacji tego białka (Ryc. 4.6 B). Inaczej zmieniała się podczas odpowiedzi na suszę akumulacja białka szoku cieplnego o masie 70 kDa (HSP70). Wśród badanych genotypów największe spadki w poziomie akumulacji tego białka widoczne były u linii Cam (71,92). Natomiast w odmianie Stratus (62,79) i Maresi (44, 86) zmiany ilościowe izoform tego

białka nie były jednolite, dla jednej z nich zaobserwowano wzrost, a dla drugiej spadek akumulacji. W odmianie Sebastian białko to nie różnicowało roślin poddawanych stresowi suszy od roślin kontrolnych. W klasie białek szoku cieplnego o masie 100 kDa (HSP100) zidentyfikowano białko opiekuńcze kazeino-litycznej proteazy serynowej (ClpC, ang. *Caseino-lytic Protease Chaperone*), biorące udział w degradacji źle ufałdowanych białek, które wykazało podwyższony poziom akumulacji w linii hodowlanej Cam/B1/CI (82). W korzeniach pozostałych genotypów jęczmienia nie zauważono istotnych zmian ilościowych w profilu ekspresji tego białka. Innym zidentyfikowanym białkiem, różnicującym rośliny poddawane stresowi suszy od roślin kontrolnych jest białko należące do rodziny białek odpowiadających na stres chłodu (COR, ang. *Cold-Regulated Protein*). Znaczący wzrost poziomu akumulacji tego białka zaobserwowano dla trzech badanych genotypów: Maresi (7), Cam/B1/CI (5) i Sebastian (50). W przypadku odmiany Stratus plamka reprezentująca to białko na elektroforegramach nie wykazywała zmian ilościowych pomiędzy próbkami kontrolnymi a ekstraktami z korzeni roślin poddanych stresowi suszy. Zidentyfikowano także białka należące do rodziny uniwersalnych białek stresowych (USP, ang. *Universal Stress Proteins*), których poziom akumulacji znacząco wzrósł u odmiany Sebastian (52) i Maresi (11,52), przy czym odmiana rodzicielska charakteryzowała się obecnością tego białka tylko na elektroforegramach wykonanych dla roślin poddawanych deficytowi wody. Ponadto u Maresi (32,71) znaleziono plamki reprezentujące białka z rodziny białek późnej embriogenezy (LEA, ang. *Late Embryogenesis Proteins*), których poziom akumulacji uległ znaczącemu podwyższeniu w korzeniach roślin wzrastających w warunkach stresu. Dla pozostałych genotypów nie zauważono zmian w intensywności plamek reprezentujących białka LEA. Odmiany Stratus (10) i Sebastian (10) charakteryzowały się spadkiem poziomu akumulacji białek z rodziny germin, które pełnią ważne funkcje w procesach embriogenezy jak i w odpowiedzi na stesy środowiskowe.

Enzymy uczestniczące w szlakach biosyntezy związków osmotycznie czynnych w warunkach suszy charakteryzowały się znaczącymi zmianami ilościowymi w porównaniu do roślin kontrolnych. Dehydrogenaza aldehydu betainowego, enzym uczestniczący w syntezie kluczowego osmolitu - betainy glicynowej różnicowała wszystkie badane genotypy jęczmienia: Maresi (39,99), CamB1/CI (63), Stratus (51), Sebastian (73,74) i wykazała znaczący wzrost poziomu akumulacji w warunkach suszy. Największe zmiany w ekspresji tego enzymu widoczne były u odmiany Maresi (Ryc. 4.6 A). Enzymem zaangażowanym w katabolizm proliny jest dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksyłanu, która wykazała podwyższony poziom akumulacji w korzeniach linii

Cam/B1/CI (62), Stratus (50) i Sebastian (34), przy czym u Maresi nie zaobserwowano ilościowych zmian białka w porównaniu do kontroli.

Białka uczestniczące w procesach neutralizowania wolnych rodników także zostały zidentyfikowane jako różnicujące korzenie roślin wzrastających w warunkach deficytu wody od kontrolnych. Wśród nich duża grupa enzymów charakteryzowała się obniżonym poziomem akumulacji u roślin wzrastających w warunkach suszy. Przykład może stanowić dysmutaza ponadtlenkowa zależna od manganu, która w odpowiedzi na deficyt wody wykazała obniżoną akumulację w korzeniach wszystkich badanych genotypów: Maresi (28), CamB1/CI (107), Stratus (71), Sebastian (39), przy czym największy spadek nastąpił u linii hodowlanej Cam/B1/CI. Plamka na żelu, która zidentyfikowana została jako peroksydaza askorbinianowa, wykazywała istotny spadek intensywności dla odmian Maresi (98), CamB1/CI (19) i Stratus (12). Enzymem biorącym udział w procesach detoksykacji jest *S*-transferaza glutationowa, której obniżony poziom akumulacji obserwowano w korzeniach linii hodowlanej Cam/B1/CI (90) wzrastającej w warunkach suszy. W innych odmianach plamki reprezentujące to białko na elektroforegramach nie wykazywały znaczących różnic w intensywności pomiędzy próbkami uzyskanymi z korzeni roślin hodowanych przy różnym dostępie wody. Innym enzymem zaangażowanym w usuwanie reaktywnych form tlenu jest liaza laktoglutationowa, której stopień ekspresji uległ dwukrotnemu spadkowi w linii hodowlanej Cam/B1/CI (29), natomiast u odmian Maresi (96), Stratus (24), i Sebastian (13) białko to wykazało dwukrotny wzrost poziomu akumulacji u roślin wzrastających w warunkach deficytu wody. Peroksydazę dwucysteinową, biorącą udział w usuwaniu nadtlenu wodoru, zidentyfikowano w linii hodowlanej Cam/B1/CI (6), gdzie charakteryzowała się podwyższoną akumulacją w korzeniach roślin poddawanych stresowi suszy. Intensywność plamek reprezentujących peroksydazę na elektroforegramach uzyskanych dla pozostałych badanych odmian nie wykazała istotnych zmian poziomu ekspresji tego enzymu pod wpływem deficytu wody.

Wśród białek pełniących funkcje związane z przemianami metabolicznymi węgla najwyższym stopniem zmian akumulacji charakteryzował się enzym zaangażowany w proces glikolizy - mutaza bisfosfoglicerynianowa, który u odmiany Maresi (41) wykazał aż 15-krotny wzrost poziomu akumulacji w korzeniach roślin wzrastających w warunkach suszy. Korzenie pozostałych linii jęczmienia: CamB1/CI (66), Stratus (57), Sebastian (36) także charakteryzował względny wzrost ilości tego białka kształtujący się w granicach od 3 do 5-krotnie wyższych w stosunku do roślin kontrolnych. Zbliżony stopień reakcji na deficyt wody wykazała dekarboksylaza pirogronianowa, której poziom ekspresji dla

badanych genotypów: Maresi (85), CamB1/CI (65), Stratus (53), Sebastian (57) był podwyższony w warunkach stresu. Najwyższym względnym wzrostem poziomu akumulacji (8-krotny) charakteryzowała się linia Cam B1/CI, natomiast u odmiany Maresi białko to wykryto tylko na elektroforegramach uzyskanych dla roślin wzrastających w warunkach deficytu wody. Dwie izoformy fruktokinazy zidentyfikowane zostały w korzeniach badanych linii jęczmienia. U trzech odmian, Maresi (26,29), Cam/B1/CI (34,106) i Stratus (26,27) akumulacja tego enzymu spadła w korzeniach narażonych na suszę, natomiast u odmiany Sebastian intensywność plamki reprezentującej na żelu to białko nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi a ekstraktami z korzeni stresowanych roślin. Zmiany poziomu akumulacji aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu obserwowane były tylko u odmiany Stratus (32), gdzie widoczny był spadek ilości tego enzymu. Fosfoglukomutaza, enzym uczestniczący w procesie glikogenogenezy, zidentyfikowany został w przypadku odmian Stratus (61) i Cam/B1/CI (68), gdzie zaobserwowano istotne obniżenie poziomu akumulacji tego białka w korzeniach wzrastających w warunkach stresu.

Amoniakoliza fenyloalaniny, kluczowe białko szlaku fenylopropanoidowego, w którym następuje synteza wielu fenolowych metabolitów wtórnych oraz monomerów wykorzystywanych w biosyntezie lignin, wykazała obniżony poziom akumulacji w warunkach suszy dla trzech z badanych genotypów: Cam/B1/CI (75,77,91), Stratus (67) i Sebastian (38,42). Podobny charakter odpowiedzi na stres suszy stwierdzono dla *O*-metylotransferazy kwasu kawowego różnicującej warunki stresowe i kontrolne dla odmian Cam/B1/CI (27,104) i Stratus (23). Kolejnym zidentyfikowanym enzymem związanym ze szlakiem fenylopropanoidowym była reduktaza izoflawonowa, której spadek akumulacji widoczny był u linii hodowlanej Cam/B1/CI (33), natomiast wzrostem poziomu tego enzymu w warunkach suszy charakteryzowała się odmiana Sebastian (17). Co ciekawe, w korzeniach odmiany Maresi żaden ze zidentyfikowanych enzymów metabolizmu wtórnego nie zmienił istotnie poziomu akumulacji w odpowiedzi na deficyt wody.

W grupie białek związanych z przemianami azotu zaledwie jedno białko odpowiadało wyraźną zmianą w profilu akumulacji na zadany stres środowiskowy. Syntaza *S*-adenozylometioninowa i jej izoformy różnicowała trzy genotypy jęczmienia: Cam/B1/CI (44,45), Stratus (41) i Sebastian (29,30). U odmian tych poziom akumulacji tego enzymu uległ znaczącemu spadkowi u roślin wzrastających w warunkach stresowych w porównaniu do kontroli. Plamka reprezentująca to białko na elektroforegramach nie

wykazywała istotnych zmian intensywności dla próbek uzyskanych z korzeni odmiany Maresi.

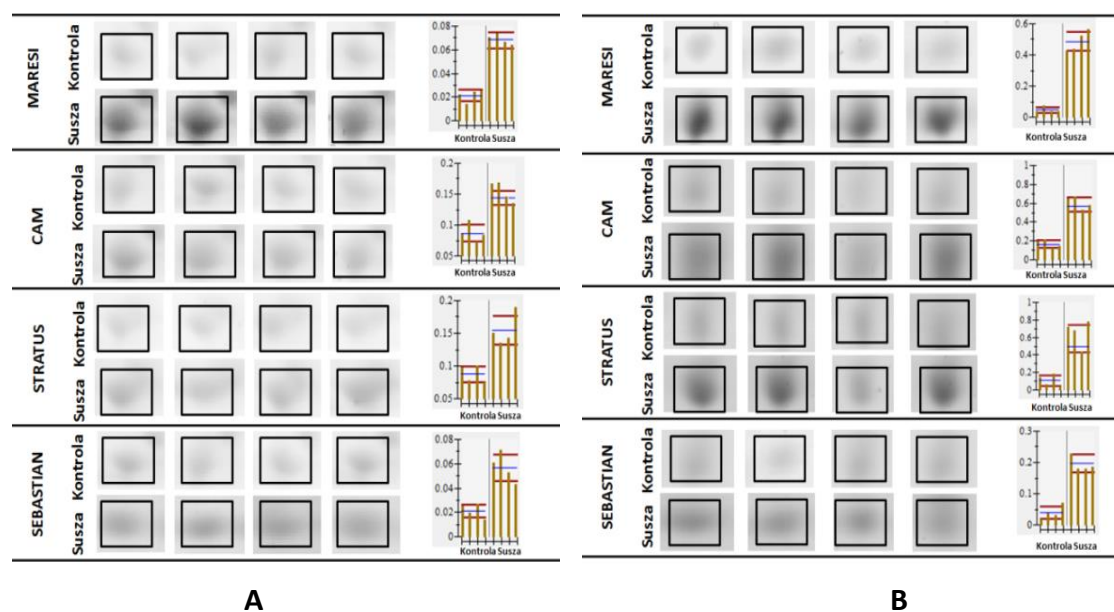
U odmian Maresi (37) i Stratus (45) zidentyfikowano podjednostkę enzymu biorącego udział w syntezie wysokoenergetycznego związku adenozyno-5'-trifosforanu – syntazę ATP, której poziom akumulacji u korzeniach obu linii uległ obniżeniu w odpowiedzi na niedobór wody. Natomiast u genotypów Cam/B1/CI (69,86) i Stratus (59,60) w warunkach suszy wykryto zmniejszoną ilość adenozynotrifosfatazy (ATP-azy), integralnego białka błonowego, zdolnego do transportu protonów.

W odmianie Sebastian (1) zidentyfikowano enzym biorący udział w modyfikacji ścian komórkowych - syntazę kalozy, której poziom akumulacji w warunkach stresu suszy został znacząco zwiększony w porównaniu do roślin wzrastających w warunkach kontrolnych. Dla genotypów Maresi (17), Stratus (18,19,20) i Sebastian (12) znaleziono także przedstawicieli białek regulatorowych z rodziny 14-3-3, które w próbkach uzyskanych z korzeni wzrastających w warunkach deficytu wody wykazywały zwiększoną intensywność plamek na odpowiednich elektroforegramach w porównaniu do kontroli. Odmiany Maresi (38) i Cam/B1/CI (52,53) charakteryzowały się obniżoną ekspresją jednej z podjednostek 26 proteazy, enzymu zaangażowanego w degradację ubikwitynowanych białek.

W odpowiedzi na niedobór wody zmiany poziomu akumulacji wykazały białka związane z regulacją ekspresji genów, m.in. czynnik inicjujący translację u odmian Maresi (9), Cam/B1/CI (9) oraz czynnik elongacji translacji u odmiany Sebastian (28). Zwiększony poziom czynnika inicjującego i czynnika elongacji widoczny był odpowiednio w odmianach Maresi i Sebastian, natomiast linię hodowlaną Cam/B1/CI charakteryzował spadek akumulacji czynnika inicjującego w korzeniach roślin poddanych stresowi w porównaniu do korzeni kontrolnych.

Analiza porównawcza czterech genotypów jęczmienia pokazała, że 24 zidentyfikowane białka zmieniły poziom akumulacji w przypadku co najmniej dwóch badanych odmian (Tab. 4.7). W przypadku 6 białek zaobserwowano, że stres suszy wpłynął na zmianę poziomu akumulacji, która widoczna była we wszystkich czterech genotypach. W grupie białek niezidentyfikowanych, 19 białek wykazało zmiany poziomu akumulacji w co najmniej dwóch genotypach, a 2 z nich zmieniły profil ekspresji w czterech odmianach. Te obserwacje mogą sugerować pewien stopień konserwacji odpowiedzi na stres suszy pomiędzy badanymi odmianami jęczmienia. Przykładowy profil

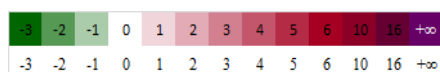
zmian poziomu akumulacji białek dla czterech badanych genotypów przedstawiono na rycinie 4.6.



Ryc. 4.6. Zmiana profilu akumulacji wybranych białek w warunkach deficytu wody dla czterech badanych odmian jęczmienia. A – wzrost poziomu akumulacji dehydrogenazy aldehydu betainowego, B – wzrost poziomu akumulacji białka szoku cieplnego sHSP16.9.

Tab. 4.7. Białka, których poziom akumulacji pod wpływem suszy uległ zmianie w przynajmniej dwóch odmianach jęczmienia. Skala kolorów wskazuje na stopień zmian akumulacji białek indukowanych suszą w stosunku do roślin kontrolnych. Symbol ∞ oznacza obecność białka tylko na elektroforegramach roślin poddawanych stresowi suszy. Pozycja odnosi się do identyfikacji białek w tabeli 4.1-4.4.

Białko	Maresi	Cam	Stratus	Sebastian	Pozycja	Funkcja
Fosfoglukomutaza 1		-1,3	-1,4		D7	Metabolizm węgla
Fruktokinaza	-1,7	-2	-2		H2	
Dehydrogenaza pirogronianowa, podjednostka alfa	∞		1,3		A3	
Dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NADP	1,8	2,3		∞	I1	
Dekarboksylaza pirogronianowa 1	∞	7,8	2,3	3,3	K2	
Mutaza bisfosfoglucerynianowa	14,1	3,1	5,4	4	K3	
Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	-1,7		-1,4		A4	Transport elektronów
V-tytu ATPaza, podjednostka A		-1,3	-1,2		D4	
O-metylotransferaza kwasu kawowego 1		-1,7	-1,4		D6	Metabolizm wiotomy
Amoniakoliza fenylalaniny		-2,3		-1	E3	
		-2,3	-2,7	-2,7	J3	
Reduktaza izoflawonowa		-1,3		1,1	E4	
Syntaza S-adenozylometioninowa		-2		-1,7	E1	Metabolizm azotu
		-2	-1,7	-1,4	J1	
Dehydrogenaza delta-1-pirolino-karboksydanu, mitochondrialna		1,4	1,4	1,6	J2	Mechanizmy obronne
Liaza laktoglutationowa	1,4	-1,7	1,3	2,1	K5	
Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	-2	-1,4	-2	-2	K7	
Peroksydaza L-askorbinianowa, cytoplazmatyczna	-1,4	-1,4	-1,3		H1	
Germina 8-5	-2		-2	-2	G1	
Białko z rodziny 14-3-3			1,4	1,3	F4	
Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	2,2			1,8	B3	
Dehydrogenaza aldehydu betainowego	2,9	1,5	1,8	1,8	K6	
Białko odpowiadające na stres chłodu	7,3	2		4,7	I4	
Białko szoku cieplnego 70 kDa	-2,3	-2	-1,7		H3	
	3,9	2,3			C1	
Białko szoku cieplnego 16,9 kDa	10,3	3,5	4,9	3,9	K8	
Białka z rodziny hydrolaz trifosfonukleozydów zawierających pętlę P (P-loop)	5,1	2,2		16,3	I2	
Niezidentyfikowane	2,4		2		A1	Nieznane
Niezidentyfikowane	4		3,4		A2	
Niezidentyfikowane	∞			2,2	B1	
Niezidentyfikowane	3,7			2,2	B2	
Niezidentyfikowane		1,4	1,2		D1	
Niezidentyfikowane		1,3	1,4		D3	
Niezidentyfikowane		-2,3	-2		D5	
Niezidentyfikowane	∞			∞	E2	
Niezidentyfikowane			-1,7	-2	F1	
Niezidentyfikowane			1,8	1,5	F2	
Niezidentyfikowane			2,8	2,6	F3	
Niezidentyfikowane			-1,7	-1,7	F5	
Niezidentyfikowane			-1,7	-2	F6	
Niezidentyfikowane	2,9	1,9		2,1	I3	
Niezidentyfikowane		1,4	1,4	1,3	J4	
Niezidentyfikowane	∞	∞	3,8	1,9	K4	



4.2. Analiza proteomiczna populacji mapującej jęczmienia

Analiza profilu akumulacji białek prowadzona była na korzeniach populacji mapującej jęczmienia jarego, stanowiącej pokolenie F₈ rekombinowanych linii wsobnych uzyskanych techniką pojedynczego ziarna, poprzez krzyżowanie genotypów rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI. Zmiany na poziomie proteomu monitorowano za pomocą jednowymiarowych i wielowymiarowych technik statystycznych, z wykorzystaniem kilku podejść metodycznych.

W pierwszym podejściu (analiza celowana) dla każdej linii populacji mapującej M_{Cam} zmiany profilu akumulacji białek porównywano pomiędzy korzeniami roślin poddawanych działaniu suszy a korzeniami roślin kontrolnych, dzięki czemu możliwe było wyselekcjonowanie białek różnicujących określony genotyp w warunkach niedoboru wody. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Image Master Platinum 7.0 uwzględniając rozkład testu t-Studenta i poziom istotności (p-wartość $\leq 0,05$). W 89 liniach populacji mapującej łącznie znaleziono 2344 białek różnicujących proteom korzenia w warunkach niedoboru wody, dla których stosunek najniższej znormalizowanej wartości jednej grupy żeli, w której akumulacja danego białka była większa, do najwyższej znormalizowanej wartości drugiej grupy, w której to samo białko charakteryzowało się najniższym poziomem akumulacji, wynosił przynajmniej 1,5 (ang. *ratio*), co odpowiadało przynajmniej dwukrotnej zmianie w poziomie akumulacji w stosunku do kontroli. Spośród wszystkich badanych linii populacji mapującej M_{Cam} dla 11 genotypów wykazano stosunkowo niewielki wpływ suszy na proteom (1-10 białek różnicujących). Druga grupa to 17 genotypów, dla których stwierdzono różnice w akumulacji 11-20 białek. Największa liczba linii (33) charakteryzowała się zmianą akumulacji 21-31 białek. W przypadku kolejnych 17 genotypów różnice pomiędzy suszą i kontrolą stwierdzono dla akumulacji 31-40 białek. Natomiast najwyższy poziom zmienności proteomu (41-50 i 51-70 białek) charakteryzował odpowiednio 6 i 5 genotypów populacji mapującej (Tab.4.8).

Tab. 4.8. Liczba białek różnicujących odpowiedź na suszę poszczególnych linii populacji mapującej MCam.

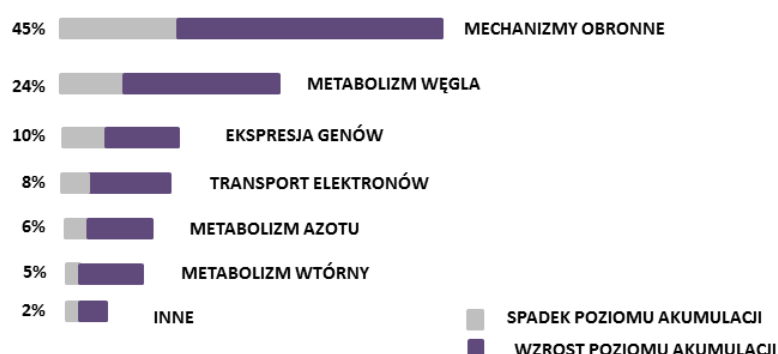
Liczba białek różnicujący	1-10	11-20	21-30		31-40	41-50	51-75
Liczba linii	11	17	33		17	6	5
Identyfikatory linii	MCam_039	MCam_021	MCam_002	MCam_069	MCam_005	MCam_001	MCam_043
	MCam_091	MCam_026	MCam_004	MCam_070	MCam_007	MCam_006	MCam_061
	MCam_093	MCam_042	MCam_014	MCam_074	MCam_010	MCam_008	MCam_076
	MCam_097	MCam_056	MCam_019	MCam_075	MCam_017	MCam_009	MCam_084
	MCam_101	MCam_058	MCam_024	MCam_078	MCam_027	MCam_048	MCam_124
	MCam_113	MCam_066	MCam_028	MCam_079	MCam_035	MCam_122	
	MCam_111	MCam_068	MCam_029	MCam_100	MCam_049		
	MCam_118	MCam_071	MCam_041	MCam_109	MCam_050		
	MCam_128	MCam_072	MCam_044	MCam_110	MCam_053		
	MCam_130	MCam_081	MCam_045	MCam_112	MCam_060		
		MCam_090	MCam_046	MCam_114	MCam_073		
		MCam_096	MCam_052	MCam_116	MCam_092		
		MCam_102	MCam_057	MCam_119	MCam_094		
		MCam_104	MCam_059	MCam_120	MCam_099		
		MCam_105	MCam_063	MCam_123	MCam_108		
		MCam_107	MCam_065	MCam_127	MCam_115		
		MCam_125	MCam_067		MCam_121		

Większość białek różnicujących, wyselekcjonowanych dla wszystkich linii populacji mapującej (2344 białek) charakteryzowała się wzrostem poziomu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy (Tab. 4.9). Stosunek liczby białek wykazujących wzrost ekspresji do białek o obniżonej akumulacji kształtował się średnio w granicach 2:1 dla każdej linii MCam. Odmienny charakter odpowiedzi wykazały jedynie trzy linie (MCam_014, MCam_056, MCam_113), u których dominowały białka wykazujące spadki w poziomie akumulacji. Wśród wszystkich genotypów najmniejszy stopień zróżnicowania białek (≤ 4 białka różnicujące) pomiędzy roślinami wzrastającymi w warunkach suszy a kontrolą wykazywały linie MCam_039, MCam_097, MCam_118 i MCam_130. Natomiast linie, które charakteryzowały się największą liczbą białek różnicujących (≥ 60 białek różnicujących) to MCam_043, MCam_084, MCam_124.

Tab. 4.9. Ogólna tendencja zmian poziomu akumulacji białek różnicujących dla wszystkich linii populacji mapującej MCam.

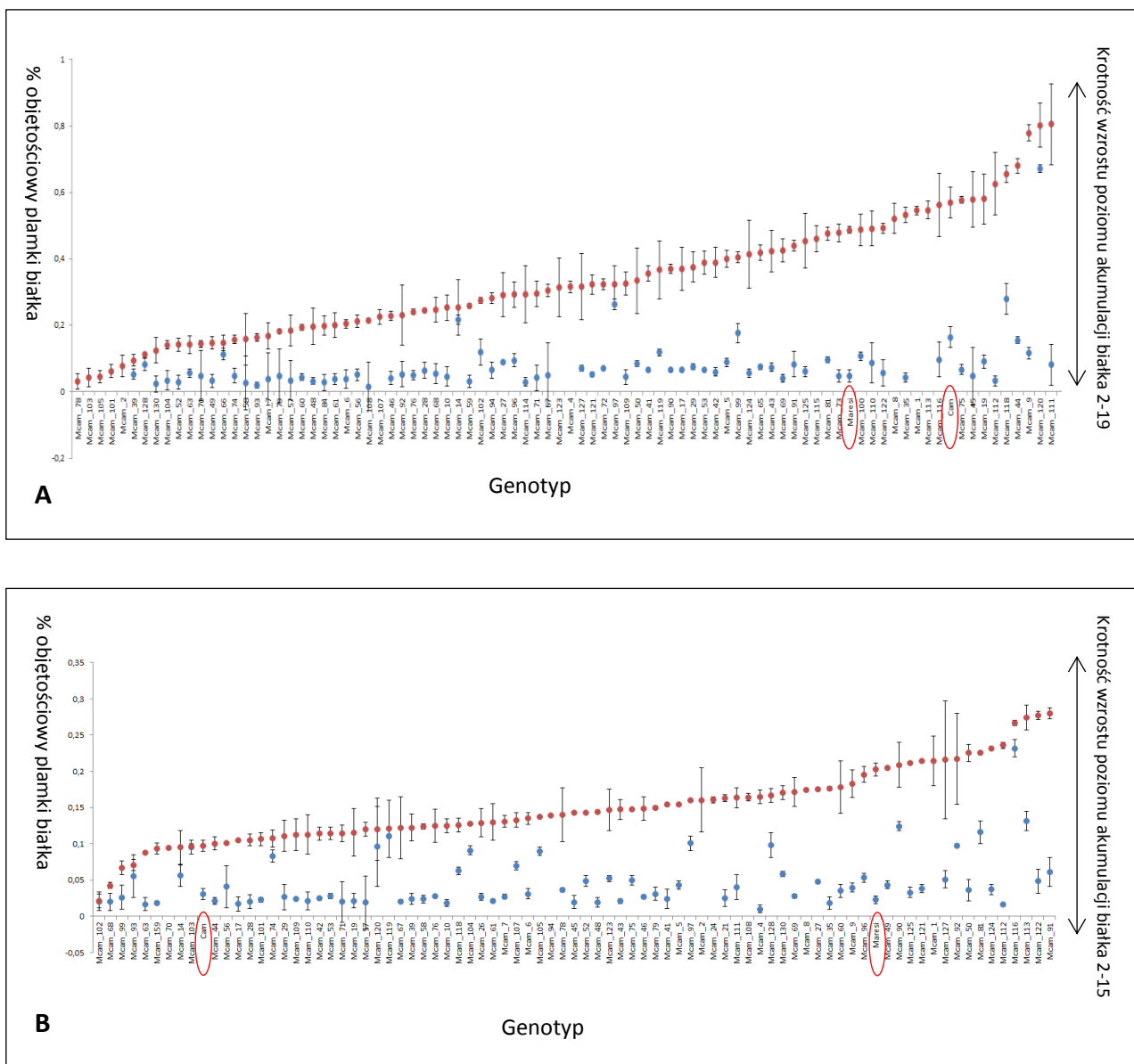
Liczba białek różnicujących	2344	
Wzrost poziomu akumulacji	1631	70%
Spadek poziomu akumulacji	715	30%

Do identyfikacji białek różnicujących wybrano linie reprezentujące różny poziom zmienności proteomu, łącznie 30 genotypów z populacji mapującej. Identyfikacji metodami spektrometrii mas poddano około 500 białek, przy czym zidentyfikowano około 50% z nich. Większość zidentyfikowanych białek (45%) związanych było z mechanizmami obronnymi. Dla większości białek (70%) w tej grupie obserwowano wzrost poziomu akumulacji w korzeniach wzrastających w warunkach deficytu wody w porównaniu do kontroli. Najliczniej reprezentowane podgrupy to enzymy antyoksydacyjne (30%) i białka szoku cieplnego (20%). Enzymy zaangażowane w metaboliczne przemiany węgla stanowiły 24% z wszystkich zidentyfikowanych białek. Większość z nich również wykazała wzrost poziomu akumulacji w warunkach suszy. Do najliczniej reprezentującej podgrupy należały enzymy związane z procesem glikolizy, których względna ilość wzrastała w warunkach deficytu wody. Pozostałe białka związane były z regulacją ekspresji genów (10%), transportem elektronów (8%), metabolizmem azotu (8%), metabolizmem wtórnym (5%) oraz innymi funkcjami (2%). Również w tych kategoriach dominowało zwiększenie poziomu akumulacji białek w warunkach niedoboru wody w porównaniu do warunków kontrolnych (Ryc. 4.7).

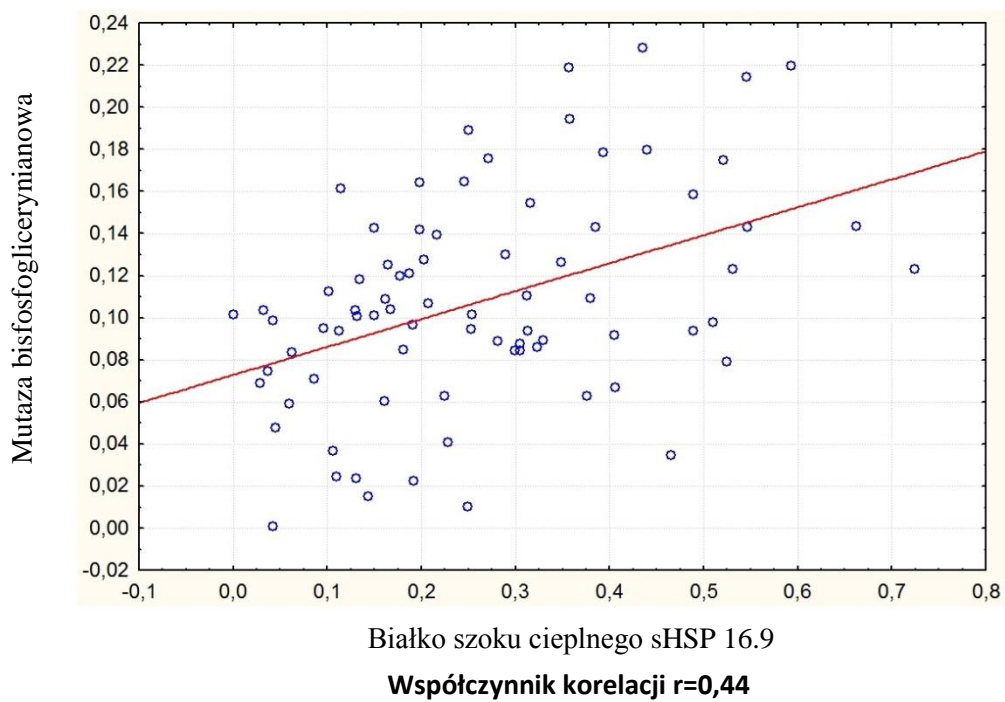


Ryc.4.7. Funkcjonalny podział zidentyfikowanych białek korzeni z uwzględnieniem zmian w poziomie akumulacji w populacji mapującej MCam. Przedstawione wartości procentowe wskazują na udział każdej kategorii w całej puli zidentyfikowanych białkach.

Podobnie jak w przypadku linii rodzicielskich, w grupie białek obronnych zidentyfikowano białko szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 16.9 kDa, którego istotna statystycznie zmiana poziomu akumulacji w odpowiedzi na niedobór wody obserwowana była we wszystkich liniach populacji mapującej, wahając się w granicach od 2 do 19 razy w stosunku do roślin kontrolnych. W obrębie białek związanych z metabolicznymi przemianami węgla, dużym poziomem zmienności charakteryzował się jeden z enzymów szlaku glikolizy - mutaza bisfosfoglicerynianowa. Akumulacja tego enzymu różnicowała 90% badanych linii rekombinacyjnych, wykazując poziom od 2 do 15-krotnie wyższy w korzeniach roślin wzrastających w warunkach deficytu wody w porównaniu do warunków kontrolnych. Wykres rozrzutu dla różnicy wartości procenta objętościowego plamki w roślinach poddanych suszy i roślinach kontrolnych, czyli efektu suszy białka szoku cieplnego sHSP16.9 względem mutazy bisfosfoglicerynianowej ujawnił umiarkowany poziom korelacji ($r=0,44$) pomiędzy badanymi liniami, co może wskazywać na pewnego rodzaju podobieństwo w reakcji na suszę tych dwóch białek w obrębie populacji mapującej (Ryc. 4.8; Ryc. 4.9).

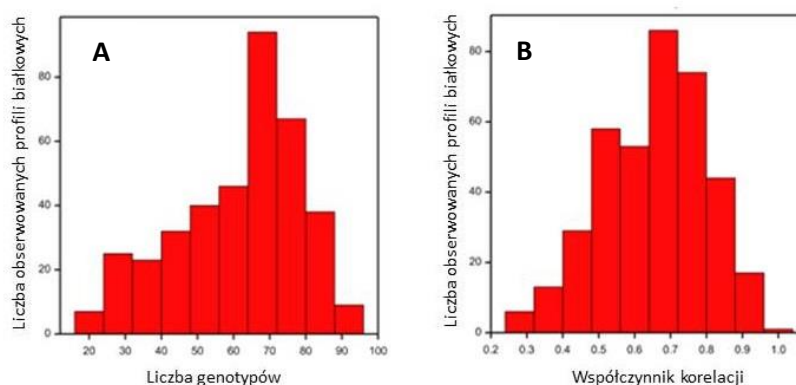


Ryc. 4.8. Profile akumulacji **A** - białka szoku cieplnego sHSP16.9 i **B** - mutazy bisfosfoglicerynianowej w liniach populacji mapującej MCam i odmianach rodzicielskich w warunkach suszy (kolor czerwony) i warunkach kontrolnych (kolor niebieski). Obserwowane zmiany poziomu akumulacji białek we wszystkich badanych genotypach były istotne statystycznie (p -wartość ≤ 0.05). Wartości profili białek uszeregowane zostały zgodnie ze wzrastającym efektem suszy. Odmiany rodzicielskie zaznaczono kolorem czerwonym.



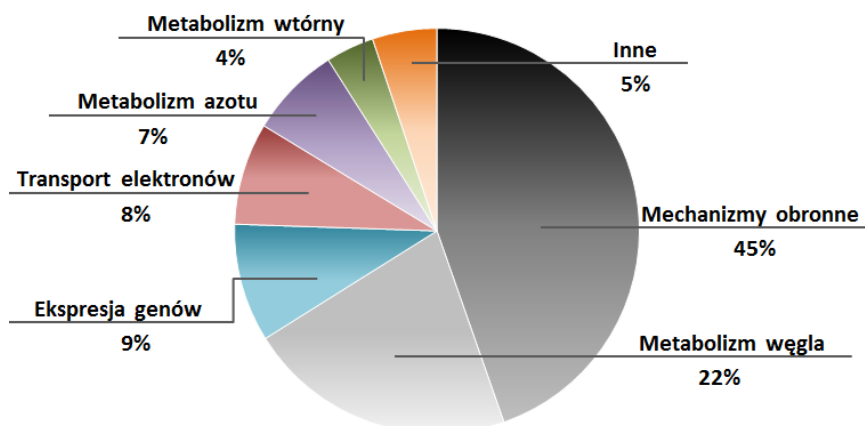
Ryc. 4.9. Wykres rozrzutu dla efektu suszy dla białka szoku cieplnego sHSP16.9 względem mutazy bisfosfoglicerynianowej.

Zastosowana procedura analizy niecelowanej, bazująca na elektroforogramach referencyjnych pochodzących z indywidualnej analizy odmian rodzicielskich i linii populacji mapującej M_{Cam} pozwoliła na utworzenie 825 zestawów połączeń (zbiorów) pomiędzy plamkami reprezentującym określone białka na żelu elektroforetycznym. Ze względu na niedoskonałość działania algorytmów wykorzystywanych w programie Image Master Platinum 7.0 i możliwość powstawania nieprawidłowych połączeń plamek konieczne było sprawdzenie poprawności tworzenia zbiorów, poprzez ich przejrzanie a następnie ewentualną edycję lub usunięcie. Modyfikowanie błędnie powstałych połączeń pomiędzy plamkami (łączenie/dzielenie plamek) było niemożliwe, ze względu na konieczność zachowania tej samej numeracji białek w analizie globalnej jak i w indywidualnej analizie pojedynczych genotypów. W rezultacie odrzucono 444 nieprawidłowo utworzonych zbiorów, będących efektem błędów działania programu jak również wynikających z różnic w umiejscowieniu poszczególnych białek na elektroforogramach, podczas przebiegu rozdziału elektroforetycznego. Niepoprawnie tworzone zestawy połączeń powstawały głównie na skutek łączenia artefaktów występujących na żelu elektroforetycznym, takich jak zanieczyszczenia w postaci smug, niecałkowicie rozdzielonych białek, czy cząsteczek barwnika. Odrzucone zestawy połączeń plamek obecne były w niewielkiej liczbie linii populacji mapującej, nieprzekraczającej 20. Pozostałe zbiory – 381 połączeń białkowych zastosowano jako podstawę całościowej analizy zmian proteomu w warunkach niedoboru wody dla odmian rodzicielskich i linii potomnych populacji M_{Cam}. Wyselekcjonowane zbiory białek obserwowane były dla 20-91 genotypów i większość z nich charakteryzowały się wysokim ($0,5 \leq r \leq 0,7$) i bardzo wysokim ($0,7 \leq r \leq 0,9$) współczynnikiem korelacji pomiędzy powtórzeniami technicznymi rozdziałów elektroforetycznych (wg. skali Stanisza) (Ryc. 4.7).



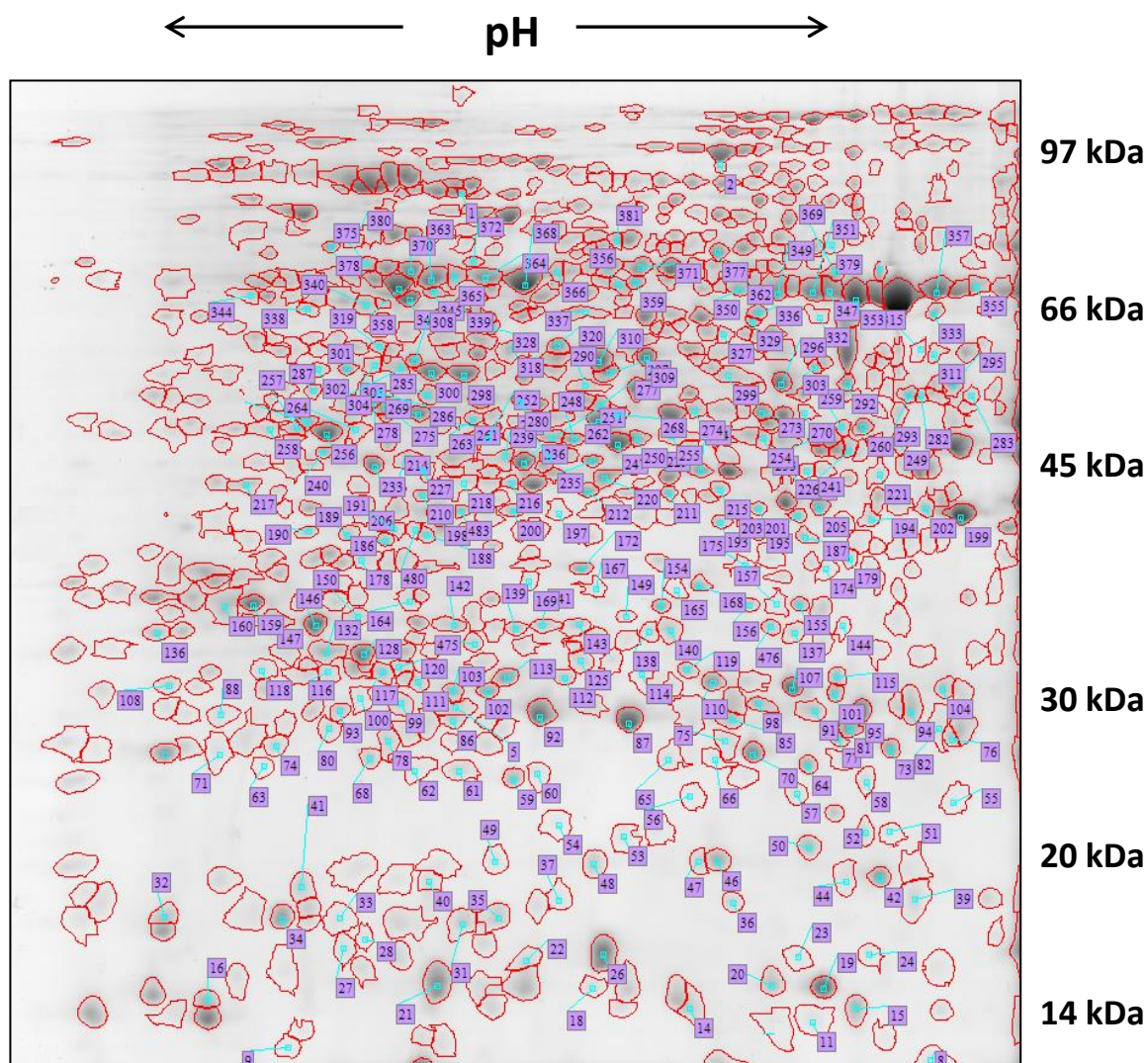
Ryc. 4.7. Charakterystyka obserwowanych profili białkowych w odniesieniu do liczby genotypów (A) i współczynnika korelacji pomiędzy powtórzeniami technicznymi rozdziałów elektroforetycznych (B).

Analiza wariancji (p-wartość <0,05 z poprawką Bonferroniego) wykazała, że 381 białek poddanych analizie niecelowanej cechowały istotne statystycznie różnice w poziomie akumulacji w obrębie wszystkich linii hodowlanych i genotypów rodzicielskich. Białka te poddano identyfikacji metodami spektrometrii mas. Zidentyfikowano 231 białek, które sklasyfikowano w grupy w zależności od pełnionych funkcji biologicznych. Największą grupę stanowiły białka, których funkcje związane są z mechanizmami obronnymi (103 białka). Drugą liczną grupą to białka zaangażowane w przemiany metaboliczne węgla (50 białek). Kolejne grupy tworzyły białka związane z regulacją ekspresji genów (22 białka), z transportem elektronów (19 białek), z metabolizmem azotu (17 białek) i metabolizmem wtórnym (10 białek). Pozostałe 10 białek, które pełnią funkcje strukturalne i regulacyjne m.in. w regulacji cyklu komórkowego, czy uczestniczą w przekazywaniu sygnałów, sklasyfikowano w jedną grupę określoną mianem „inne” (Ryc. 4.8).



Ryc. 4.8 Klasyfikacja zidentyfikowanych białek w liniach populacji mapującej MCam.

Elektroforegram z zaznaczonymi 381 białkami, wykazującymi zmiany w poziomie akumulacji przedstawiono na rycinie 4.9 (rycina w większej rozdzielczości umieszczona została na płycie CD). Nazwy białek zgodnie z numeracją przedstawioną na elektroforegramie wraz ze średnimi wartościami akumulacji w warunkach suszy i kontroli przedstawiono w tabeli 4.8.



Ryc. 4.9. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, wykazującymi istotne stystycznie zmiany w poziomie akumulacji w obrębie linii populacji mapującej i linii rodzicielskich. Nazwy białek przedstawiono w Tab. 4.8.

Tab. 4.8. Białka zidentyfikowane w korzeniach populacji mapującej M_{Cam}, które zmieniły poziom akumulacji w odpowiedzi na suszę. Kolorem żółtym oznaczono białka, dla których średni efekt suszy był istotny statystycznie, zielone – białka, dla których interakcja genotyp \times susza była istotna statystycznie, czerwony – białka, dla których efekt suszy i interakcja genotyp \times susza były istotne statystycznie.

Numeracja na żelu	Liczba genotypów wchodzących w skład profilu	Białko	Proces biologiczny	Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami technicznymi	p-wartość dla różnic pomiędzy liniami	p-wartość dla efektu suszy	p-wartość dla interakcji genotyp \times susza	Średnia wartość plamki w kontroli log ₂ (100 \times % vol)	Średnia wartość plamki w suszy log ₂ (100 \times % vol)	Efekt suszy
1	28	Białko z rodziny 14-3-3	Inne	0,71	9,73E-08	0,00E+00	1,75E-05	3,30	3,80	0,49
2	51	Białko z rodziny 14-3-3	Inne	0,53	3,38E-26	1,34E-03	7,99E-02	5,10	5,19	0,09
3	69	Białko z rodziny 14-3-3 B	Inne	0,68	1,41E-33	1,28E-01	1,71E-03	3,19	3,23	0,04
4	87	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	0,60	2,38E-35	3,66E-27	4,04E-04	4,73	4,87	0,14
5	32	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	0,60	3,26E-09	7,08E-13	4,54E-03	4,82	5,03	0,21
6	20	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	0,69	1,19E-11	2,39E-02	1,65E-04	4,65	4,71	0,06
7	40	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-C	Inne	0,53	0,00E+00	1,22E-04	7,80E-01	4,57	4,64	0,08
8	78	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,49	1,60E-23	1,76E-01	5,10E-01	5,91	5,94	0,03
9	73	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,86	7,56E-14	0,00E+00	3,86E-01	3,98	5,71	1,73
10	37	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,53	1,78E-10	1,02E-03	1,01E-01	3,75	3,83	0,09
11	77	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,78	0,00E+00	0,00E+00	9,34E-21	3,52	4,84	1,31
12	55	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,54	1,44E-17	2,49E-07	3,24E-05	3,98	4,12	0,13
13	88	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0,64	0,00E+00	4,03E-01	2,85E-04	6,09	6,12	0,03
14	91	Białko szoku cieplnego 17.6 kDa	Mechanizmy obronne	0,79	0,00E+00	9,72E-07	5,83E-04	6,31	6,99	0,68
15	89	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	0,67	0,00E+00	1,38E-01	1,47E-01	5,43	5,45	0,02
16	82	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	0,86	8,79E-25	0,00E+00	5,69E-16	3,56	5,02	1,45
17	29	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	0,95	3,27E-23	2,48E-01	8,82E-03	3,77	3,74	-0,03
18	49	Aldolaza 2-hydro-3-deoksyfosfoheptonowa	Metabolizm węgla	0,33	7,48E-06	4,85E-10	3,22E-02	3,79	3,49	-0,30
19	50	Proteasom 26S, podjednostka 4, homolog	Mechanizmy obronne	0,75	1,67E-15	0,00E+00	1,73E-04	4,98	4,19	-0,78
20	28	Proteasom 26S, podjednostka 6A, homolog	Mechanizmy obronne	0,26	5,44E-06	6,89E-09	2,37E-02	4,97	4,68	-0,29
21	67	Proteasom 26S niezależny od ATP	Mechanizmy obronne	0,42	3,26E-18	1,86E-01	5,39E-03	3,75	3,78	0,03
22	81	Proteasom 26S	Mechanizmy obronne	0,87	0,00E+00	8,72E-05	7,36E-01	5,53	5,59	0,06
23	46	Białko rybosomalne S8, fragment	Ekspresja genów	0,33	9,12E-13	7,94E-06	2,78E-02	3,96	4,14	0,17
24	73	Białko rybosomalne 30S S4, mitochondrialne	Ekspresja genów	0,60	2,76E-32	6,77E-22	1,27E-04	4,69	4,41	-0,27
25	53	Białko rybosomalne 40S S4	Ekspresja genów	0,52	1,36E-10	7,76E-01	8,92E-01	4,05	4,04	-0,01
26	58	Białko 60 kDa indukowane jasmonionami	Mechanizmy obronne	0,67	2,82E-27	2,44E-15	3,06E-05	4,83	4,58	-0,25
27	64	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,54	1,64E-09	1,79E-07	5,04E-01	6,40	6,22	-0,19
28	67	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,47	1,08E-20	3,25E-15	5,89E-05	5,63	5,92	0,29
29	35	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,81	9,25E-11	5,40E-07	3,01E-02	4,57	4,23	-0,33
30	75	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,66	1,94E-21	1,10E-05	3,51E-08	6,22	6,06	-0,16
31	84	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,62	2,35E-33	1,17E-07	4,56E-06	5,57	5,49	-0,09
32	72	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,84	0,00E+00	9,32E-31	5,96E-06	4,99	5,23	0,23
33	60	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,54	7,34E-17	0,00E+00	2,74E-02	5,90	6,39	0,49
34	20	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0,68	3,04E-04	9,23E-01	1,98E-01	4,28	4,27	-0,01
35	28	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0,68	2,90E-12	2,98E-01	2,04E-01	4,23	4,27	0,04

36	56	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0,75	1,22E-36	3,12E-02	3,56E-01	5,78	5,85	0,07
37	62	Abhydrolaza 3	Metabolizm węgla	0,79	0,00E+00	3,33E-09	5,36E-01	4,41	4,28	-0,12
38	78	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,76	0,00E+00	1,22E-14	1,63E-02	5,21	5,41	0,20
39	66	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,81	0,00E+00	2,83E-18	1,26E-02	5,14	5,37	0,24
40	64	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,71	3,59E-33	6,36E-11	6,40E-06	4,64	4,84	0,20
41	84	Aktyna 1	Inne	0,73	0,00E+00	1,74E-03	1,06E-08	6,01	5,97	-0,04
42	83	Aktyna 1	Inne	0,72	3,20E-32	5,85E-03	1,52E-05	5,81	5,86	0,04
43	65	Fosforybulotransferaza adeninowa	Metabolizm azotu	0,66	5,40E-29	3,33E-15	1,29E-04	4,43	4,15	-0,28
44	68	Adenozylohomocysteina	Metabolizm azotu	0,81	4,88E-41	1,23E-03	6,59E-06	5,48	5,54	0,07
45	58	Aldo-keto reduktaza	Metabolizm węgla	0,68	9,13E-34	1,35E-01	1,22E-01	4,57	4,54	-0,02
46	86	Aminotransferaza	Metabolizm azotu	0,59	8,12E-24	8,14E-02	3,13E-02	6,09	6,12	0,03
47	78	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,53	1,16E-26	1,12E-10	1,73E-03	4,15	3,97	-0,18
48	66	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,68	0,00E+00	6,81E-04	7,48E-06	4,41	4,34	-0,06
49	85	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,63	4,33E-37	1,03E-24	2,28E-01	4,93	4,74	-0,19
50	89	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,76	0,00E+00	5,99E-02	6,64E-05	5,41	5,43	0,02
51	65	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,52	4,83E-38	1,06E-01	4,11E-03	4,02	3,99	-0,03
52	77	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,43	1,77E-19	4,80E-01	3,36E-03	6,04	6,06	0,02
53	62	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,62	2,35E-25	9,76E-01	1,54E-05	5,03	5,03	0,00
54	63	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,61	2,30E-22	4,16E-02	1,77E-01	4,35	4,42	0,08
55	73	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0,79	0,00E+00	8,66E-09	1,57E-03	4,48	4,36	-0,13
56	46	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0,92	0,00E+00	4,07E-01	3,96E-03	5,87	5,85	-0,02
57	83	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0,49	4,55E-28	6,90E-14	2,39E-02	6,37	6,21	-0,16
58	35	Syntaza ATP, podjednostka beta	Transport elektronów	0,57	1,52E-06	1,28E-08	3,85E-01	4,17	4,41	0,24
59	83	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0,82	0,00E+00	1,10E-34	1,22E-05	5,64	5,92	0,28
60	20	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0,87	1,89E-21	1,54E-04	2,90E-01	4,51	4,59	0,08
61	76	Syntaza ATP, podjednostka beta	Transport elektronów	0,65	1,51E-30	8,33E-05	6,58E-01	4,01	3,92	-0,08
62	32	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0,60	3,44E-12	2,12E-03	9,25E-02	4,22	4,11	-0,12
63	56	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0,73	6,34E-27	0,00E+00	1,89E-01	4,55	4,78	0,23
64	69	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0,72	1,68E-36	2,13E-37	6,04E-09	5,24	5,59	0,34
65	73	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0,68	2,72E-33	2,10E-38	1,59E-02	4,86	5,23	0,37
66	69	1-3-betagalaktozylotransferaza	Metabolizm węgla	0,76	3,09E-38	2,55E-04	3,04E-02	4,98	4,88	-0,09
67	65	Beta-glukozydaza	Metabolizm węgla	0,77	1,35E-36	4,67E-01	1,56E-02	4,68	4,71	0,03
68	61	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0,64	1,08E-23	3,01E-07	7,82E-04	4,40	4,29	-0,12
69	66	O-metylotransferaza kwasu kawowego 1	Metabolizm wtórny	0,60	1,19E-30	1,14E-02	5,89E-01	4,15	4,08	-0,06
70	29	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0,68	2,17E-16	7,20E-06	7,95E-03	3,68	3,79	0,11
71	61	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0,92	0,00E+00	0,00E+00	1,55E-06	5,44	4,81	-0,63
72	75	Syntaza kalozy	Mechanizmy obronne	0,68	8,96E-19	7,25E-12	4,94E-01	5,50	5,65	0,15
73	68	Chaperon	Mechanizmy obronne	0,82	0,00E+00	7,07E-17	1,32E-02	4,13	4,50	0,37
74	78	Białko szoku cieplnego 60 kDa, mitochondrialne	Mechanizmy obronne	0,74	1,37E-38	4,19E-01	7,31E-07	5,10	5,12	0,01
75	69	Białko obronne indukowane chityną aktywujące gibereliny	Mechanizmy obronne	0,73	5,14E-37	1,04E-01	1,63E-01	6,15	6,07	-0,08
76	62	Chitynaza, prekursor	Metabolizm węgla	0,54	1,04E-19	3,11E-14	1,28E-01	4,29	4,10	-0,19
77	80	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, protoplastowa	Mechanizmy obronne	0,48	4,03E-19	7,81E-07	7,10E-04	3,65	3,78	0,13
78	48	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0,70	0,00E+00	6,30E-01	3,95E-01	4,22	4,24	0,02
79	68	Białko późnej embriogenezy	Mechanizmy obronne	0,81	2,46E-23	0,00E+00	3,20E-04	3,26	4,01	0,76
80	52	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0,70	1,11E-07	4,77E-15	1,27E-01	4,30	5,23	0,93
81	40	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0,51	1,66E-15	1,86E-01	1,70E-01	5,24	5,29	0,05
82	33	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0,53	4,36E-07	1,10E-14	2,56E-03	4,09	4,61	0,52
83	62	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0,74	2,66E-36	7,41E-06	2,27E-02	4,13	4,26	0,13
84	52	Profitepsyna	Inne	0,61	4,55E-15	3,44E-15	4,50E-01	4,71	4,46	-0,24
85	66	Syntaza cysteinowa, prekursor	Metabolizm azotu	0,93	0,00E+00	6,12E-02	3,30E-03	4,98	4,96	-0,03
86	75	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	0,72	6,54E-33	1,57E-01	2,00E-02	4,89	4,87	-0,02

87	74	Syntaza cysteinowa, prekursor	Metabolizm azotu	0,82	0,00E+00	2,47E-01	1,08E-03	5,42	5,44	0,02
88	76	Zależna od ATP helikaza RNA z motywem DEAD-box	Ekspresja genów	0,87	0,00E+00	4,77E-29	1,09E-03	6,02	6,22	0,20
89	79	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,62	1,29E-36	9,05E-14	3,96E-05	3,93	4,12	0,20
90	31	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,42	2,03E-05	6,79E-01	1,22E-01	3,44	3,46	-0,02
91	78	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,81	1,38E-40	0,00E+00	7,28E-10	6,28	6,59	-0,29
92	37	Białko z rodziny hydrolaz laktonowych	Metabolizm węgla	0,81	6,23E-15	2,27E-01	2,57E-05	4,16	4,12	-0,04
93	40	Białko należące do kompleksu replikacyjnego GINS	Ekspresja genów	0,64	0,00E+00	4,32E-01	3,91E-01	4,20	4,22	0,02
94	67	Białko należące do kompleksu replikacyjnego GINS	Ekspresja genów	0,67	3,05E-22	0,00E+00	1,30E-04	4,56	4,97	0,41
95	29	Zależna od DNA polimeraza RNA II, duża podjednostka	Ekspresja genów	0,67	1,97E-11	8,14E-01	5,97E-02	4,73	4,74	0,01
96	20	Zależna od DNA polimeraza RNA II, duża podjednostka	Ekspresja genów	0,55	2,50E-07	9,10E-07	6,60E-01	4,10	3,91	-0,19
97	71	Ligaza ubikwityny E3	Ekspresja genów	0,72	4,59E-41	8,11E-01	3,19E-03	5,16	5,16	0,01
98	73	Czynnik elongacyjny Tu, mitochondrialny	Ekspresja genów	0,44	1,79E-12	4,73E-04	1,56E-01	4,61	4,73	0,09
99	72	Czynnik elongacyjny Tu, mitochondrialny	Ekspresja genów	0,73	1,44E-24	0,00E+00	9,15E-05	3,95	4,40	0,45
100	67	Enolaza	Metabolizm węgla	0,58	1,78E-20	3,10E-11	2,93E-02	5,79	5,94	0,16
101	79	Enolaza	Metabolizm węgla	0,61	9,39E-33	5,25E-03	9,04E-02	4,84	4,90	0,07
102	74	Esteraza	Metabolizm węgla	0,79	6,44E-21	0,00E+00	3,37E-01	5,90	6,40	0,49
103	70	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	0,64	5,12E-26	4,88E-15	2,04E-01	4,50	4,23	-0,27
104	71	Białko z rodziny F-box	Mechanizmy obronne	0,77	0,00E+00	4,88E-02	3,83E-10	5,17	5,13	-0,04
105	74	Białko z rodziny F-box	Mechanizmy obronne	0,55	2,46E-24	7,19E-11	1,11E-01	4,98	4,84	-0,15
106	61	Dehydrogenaza mrowczanowa, mitochondrialna	Inne	0,64	6,58E-18	0,00E+00	6,06E-05	4,60	5,08	0,48
107	69	Białka z rodziny formin	Inne	0,66	8,55E-25	0,00E+00	4,04E-09	5,13	5,59	0,46
108	80	Fruktokinaza	Metabolizm węgla	0,74	0,00E+00	0,00E+00	5,22E-06	6,45	5,92	-0,53
109	76	Fruktokinaza	Metabolizm węgla	0,87	0,00E+00	0,00E+00	7,39E-02	5,45	5,16	-0,28
110	48	Aldolaza fruktozo-bisfosforanu, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,69	0,00E+00	2,92E-01	3,68E-02	6,00	5,97	-0,03
111	30	Esteraza GDSL	Metabolizm węgla	0,47	4,61E-14	1,85E-06	2,49E-04	3,35	3,46	0,10
112	54	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0,56	9,06E-23	4,67E-01	1,60E-05	3,66	3,63	-0,03
113	39	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0,58	1,55E-15	1,47E-09	1,71E-03	4,87	5,16	0,29
114	67	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0,75	8,05E-38	3,87E-37	4,81E-09	5,59	5,02	-0,57
115	52	Ligaza glutaminianu amonowego 1-4, cytoplazmatyczna	Metabolizm azotu	0,80	3,53E-17	1,48E-15	5,78E-02	3,67	3,47	-0,20
116	73	Syntetaza glutaminowa GS2b	Metabolizm azotu	0,67	1,65E-23	1,23E-07	3,27E-02	4,65	4,76	0,11
117	57	Syntetaza glutaminowa GS2b	Metabolizm azotu	0,57	2,95E-16	4,42E-04	5,95E-04	4,17	4,07	-0,10
118	63	Syntetaza glutaminowa GS2b, plastydowa	Metabolizm azotu	0,46	1,42E-19	4,82E-01	2,79E-01	4,65	4,63	-0,01
119	85	Syntetaza glutaminowa	Metabolizm azotu	0,86	0,00E+00	1,18E-34	6,63E-05	7,11	7,34	0,23
120	82	Syntetaza glutaminowa	Metabolizm azotu	0,57	9,09E-26	8,37E-24	5,59E-03	5,81	5,65	-0,16
121	82	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,76	1,18E-38	0,00E+00	1,39E-18	4,45	5,12	0,67
122	82	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,71	1,45E-39	2,85E-18	6,82E-10	4,71	4,98	0,27
123	86	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,79	0,00E+00	2,30E-29	1,05E-01	5,83	6,03	0,23
124	80	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,57	4,12E-32	4,30E-02	9,24E-12	4,34	4,30	-0,03
125	51	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,67	1,63E-32	4,70E-01	6,82E-03	4,04	4,05	0,01
126	78	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0,48	6,39E-20	8,07E-01	3,57E-03	4,76	4,75	-0,01
127	77	Białko wiążące nukleotydy guaninowe	Ekspresja genów	0,79	2,28E-31	1,36E-10	8,77E-01	4,96	4,77	-0,19
128	83	ATP-aza, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0,76	0,00E+00	2,27E-13	2,66E-05	5,36	5,46	0,10
129	68	ATP-aza, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0,67	2,23E-28	2,86E-12	2,62E-05	4,57	4,70	0,13
130	49	Białko szoku cieplnego	Mechanizmy obronne	0,66	8,89E-16	2,31E-13	3,22E-05	4,26	4,00	-0,26
131	44	Białko szoku cieplnego	Mechanizmy obronne	0,56	1,01E-14	1,09E-07	8,22E-03	4,71	4,48	-0,22
132	67	Białko kompleksu CRS1	Ekspresja genów	0,67	3,32E-35	2,83E-02	5,98E-03	5,65	5,67	0,03
133	56	Białko kompleksu CRS1	Ekspresja genów	0,72	3,68E-20	4,98E-02	1,18E-01	4,75	4,70	-0,05
134	91	Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP	Metabolizm węgla	0,84	0,00E+00	6,84E-20	1,26E-14	6,01	5,86	-0,16
135	57	Reduktaza izoflawonowa	Metabolizm wtórny	0,35	1,23E-25	2,56E-01	3,85E-01	4,27	4,30	0,03
136	42	Izomeraza izopentylidifosforanowa	Metabolizm wtórny	0,81	5,55E-16	1,28E-09	4,19E-01	4,10	3,86	-0,24
137	59	Reduktoizomeraza ketolokwasowa	Metabolizm azotu	0,47	2,82E-22	6,62E-06	1,01E-03	3,77	3,92	0,15

138	88	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0,76	0,00E+00	5,63E-11	1,22E-04	5,80	5,89	0,09
139	69	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0,38	1,58E-18	5,01E-06	6,11E-01	6,11	6,00	-0,11
140	70	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0,53	3,36E-28	1,55E-12	1,21E-01	5,20	5,01	-0,19
141	58	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0,75	7,38E-32	4,95E-01	5,06E-01	4,16	4,14	-0,01
142	88	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0,74	0,00E+00	2,48E-15	1,06E-03	4,58	4,70	0,12
143	69	Peroksydaza L-askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,65	6,46E-38	8,07E-02	4,46E-04	5,83	5,79	-0,04
144	48	Peroksydaza L-askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,83	0,00E+00	0,00E+00	1,82E-08	4,32	3,79	-0,52
145	36	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0,83	0,00E+00	0,00E+00	8,40E-06	4,16	3,84	-0,33
146	69	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0,73	5,95E-20	6,51E-06	4,90E-02	4,44	4,26	-0,18
147	71	Lipoksygenaza	Metabolizm węgla	0,65	2,35E-40	1,21E-10	5,82E-05	4,79	4,98	0,19
148	44	Aldolaza L-treoninowa 1	Metabolizm azotu	0,35	3,49E-12	3,72E-01	4,06E-04	4,50	4,53	0,03
149	71	Białko wiążące światło ER 2	Mechanizmy obronne	0,49	3,44E-38	5,34E-05	2,75E-03	6,00	6,29	0,29
150	83	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,82	0,00E+00	1,31E-13	1,49E-01	6,89	6,80	-0,09
151	75	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0,85	0,00E+00	1,76E-17	1,92E-05	6,94	6,77	-0,17
152	71	Kinaza aktywowana mitogenami 6	Mechanizmy obronne	0,33	5,39E-09	1,04E-05	1,06E-01	3,91	4,18	0,27
153	51	Kinaza aktywowana mitogenami 15	Mechanizmy obronne	0,49	2,81E-17	4,22E-04	2,50E-01	4,81	4,92	0,11
154	89	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	0,69	7,44E-26	0,00E+00	3,06E-11	4,74	5,16	0,42
155	28	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa	Mechanizmy obronne	0,47	4,17E-08	2,62E-01	1,35E-02	4,24	4,29	0,04
156	67	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, peroksysomy	Mechanizmy obronne	0,89	0,00E+00	0,00E+00	5,49E-08	6,06	5,48	-0,58
157	33	Reduktaza monodehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,91	5,91E-34	0,00E+00	1,68E-07	4,40	4,58	0,18
158	52	Reduktaza monodehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0,91	0,00E+00	3,27E-03	1,29E-01	4,77	4,82	0,04
159	69	Dehydrogenaza semialdehydu aminoadypinowego zależna od NAD	Metabolizm węgla	0,71	2,52E-16	3,97E-12	3,38E-04	3,74	3,93	0,19
160	72	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,68	2,85E-23	0,00E+00	5,88E-06	3,57	4,16	0,59
161	75	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,92	0,00E+00	1,91E-14	3,57E-07	4,02	4,25	0,23
162	46	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,89	2,89E-15	2,00E-15	8,31E-08	3,70	4,93	1,23
163	65	Reduktaza mononukleotydu flawinowego zależna od NADP	Transport elektronów	0,56	2,22E-25	7,07E-17	1,22E-03	3,48	3,92	0,43
164	23	Kinazy receptorowe PRG-1 z motywem NBS-LRR	Mechanizmy obronne	0,50	6,72E-05	1,06E-05	9,82E-03	4,89	5,11	0,22
165	67	Kinaza difosfonukleozydowa 1	Transport elektronów	0,66	2,43E-21	1,31E-05	7,47E-04	4,71	4,45	-0,26
166	60	Fosfodiesteraza	Inne	0,38	4,46E-06	6,47E-01	2,31E-02	3,33	3,35	0,02
167	56	Oksydaza szczawianowa 1	Mechanizmy obronne	0,65	4,99E-19	4,12E-12	5,91E-04	4,14	4,40	0,26
168	74	Białko z rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop	Inne	0,84	1,23E-35	1,77E-17	1,51E-16	3,19	4,65	1,46
169	46	Białko z rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop	Inne	0,52	3,37E-09	3,00E-01	3,47E-02	3,07	3,04	-0,03
170	69	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu	Mechanizmy obronne	0,76	2,48E-27	2,18E-01	9,20E-01	4,34	4,39	0,05
171	81	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu 12A1, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	0,58	5,82E-32	5,51E-24	3,55E-02	4,34	4,55	0,20
172	43	Amoniakoliza fenyloalaniny	Metabolizm wtórny	0,88	1,46E-32	0,00E+00	3,93E-04	4,89	4,39	-0,49
173	43	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0,57	1,13E-12	3,53E-06	1,13E-06	3,63	3,77	0,14
174	77	Amoniakoliza fenyloalaniny	Metabolizm wtórny	0,83	1,57E-17	0,00E+00	4,96E-07	5,79	5,00	-0,79
175	70	Amoniakoliza fenyloalaniny	Metabolizm wtórny	0,71	2,10E-33	2,31E-40	6,45E-04	4,24	3,67	-0,56
176	71	Amoniakoliza fenyloalaniny	Metabolizm wtórny	0,60	1,93E-27	4,08E-01	1,68E-01	4,97	4,95	-0,02
177	35	Peroksyredoksyna	Mechanizmy obronne	0,84	1,37E-13	3,89E-15	2,72E-05	4,05	4,44	0,39
178	87	Fosfoglukomutaza 1	Metabolizm węgla	0,55	5,22E-20	3,20E-09	1,50E-05	4,13	4,25	0,13
179	90	Fosfoglukomutaza 1	Metabolizm węgla	0,70	0,00E+00	4,41E-01	6,77E-09	4,95	4,94	-0,01
180	48	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,69	0,00E+00	5,44E-02	1,23E-01	4,24	4,18	-0,06
181	62	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,90	0,00E+00	0,00E+00	4,34E-06	6,06	5,89	-0,17
182	91	Mutaza fosfoglicerynianowa	Metabolizm węgla	0,80	0,00E+00	1,16E-19	3,44E-05	6,40	6,53	0,12
183	68	Mutaza fosfoglicerynianowa, prekursor	Metabolizm węgla	0,95	0,00E+00	4,44E-16	3,69E-17	4,23	5,08	0,84
184	73	Hydrataza fosfopirogronianowa	Metabolizm węgla	0,67	1,24E-32	8,89E-04	3,21E-03	4,41	4,50	0,08
185	67	Izomeraza disiarczkowa, prekursor	Inne	0,71	8,44E-33	1,29E-01	5,50E-06	5,87	5,91	0,04
186	61	Izomeraza disiarczkowa	Inne	0,64	5,35E-20	5,50E-02	3,00E-02	5,57	5,51	-0,06
187	56	Białko PAIR1	Ekspresja genów	0,42	2,73E-07	1,47E-03	1,88E-02	5,04	5,16	0,12

188	87	Proteosom, podjednostka alfa (typ 2)	Mechanizmy obronne	0,69	1,26E-39	3,88E-06	1,74E-02	4,62	4,70	0,08
189	68	Proteosom, podjednostka alfa (typ 1)	Mechanizmy obronne	0,63	3,56E-35	1,50E-04	2,12E-07	4,39	4,32	-0,07
190	71	Proteosom, podjednostka alfa (typ 1)	Mechanizmy obronne	0,70	1,47E-12	3,11E-15	1,19E-01	3,15	3,67	0,52
191	69	Dekarboksylaza pirogronianowa 1	Metabolizm węgla	0,72	2,15E-30	6,32E-18	5,59E-01	4,32	4,54	0,22
192	25	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0,93	4,33E-32	5,87E-10	1,36E-01	4,90	4,78	-0,12
193	66	Białko regulujące kondensację chromosomów	Ekspresja genów	0,64	2,01E-27	2,92E-01	1,67E-01	3,35	3,39	0,04
194	64	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	0,86	0,00E+00	0,00E+00	9,23E-07	6,25	5,95	-0,30
195	82	Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	0,76	0,00E+00	0,00E+00	7,13E-05	6,77	6,50	-0,28
196	74	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	0,74	0,00E+00	1,65E-04	9,18E-12	4,92	4,82	-0,10
197	62	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0,89	0,00E+00	2,02E-11	5,37E-08	4,80	4,95	0,15
198	73	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0,87	0,00E+00	3,88E-13	7,48E-12	4,77	4,88	0,11
199	68	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0,79	1,07E-30	0,00E+00	1,87E-14	3,89	4,89	0,99
200	65	Dekarboksylaza S-adenozylometioninowa, proenzym	Metabolizm azotu	0,62	6,31E-36	0,00E+00	9,12E-05	3,83	3,67	-0,16
201	48	Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	0,97	0,00E+00	7,26E-01	2,01E-06	4,89	4,90	0,01
202	53	Białka szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0,76	2,29E-30	1,15E-08	5,31E-06	4,80	4,92	0,12
203	78	Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0,72	4,37E-33	1,84E-34	6,12E-06	5,10	5,57	0,47
204	65	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa	Mechanizmy obronne	0,66	7,00E-26	4,42E-02	3,50E-01	4,22	4,18	-0,05
205	53	Peroksydaza tioredoksynowa	Mechanizmy obronne	0,40	7,96E-19	3,90E-01	1,76E-04	3,95	3,92	-0,02
206	55	Czynnik transkrypcyjny BIM1	Ekspresja genów	0,33	2,11E-11	5,81E-01	1,03E-03	3,97	3,95	-0,02
207	90	Transketolaza	Metabolizm węgla	0,72	0,00E+00	1,87E-02	5,00E-03	4,90	4,94	0,04
208	72	Transketolaza	Metabolizm węgla	0,59	8,19E-41	1,02E-01	2,51E-03	4,40	4,43	0,03
209	65	Czynnik inicjacji translacji 5A	Ekspresja genów	0,74	4,16E-30	0,00E+00	9,07E-03	4,51	4,88	0,37
210	88	Czynnik inicjacji translacji	Ekspresja genów	0,71	0,00E+00	1,90E-16	1,24E-05	4,81	4,65	-0,16
211	61	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,73	7,84E-35	2,95E-07	1,14E-04	4,48	4,59	0,11
212	50	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,72	0,00E+00	8,88E-16	1,68E-04	4,67	4,23	-0,44
213	76	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,44	7,03E-23	1,31E-03	4,99E-02	4,28	4,21	-0,07
214	35	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,41	7,92E-05	3,54E-06	8,14E-03	3,30	3,52	0,23
215	75	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0,74	4,92E-36	5,70E-19	2,43E-02	4,61	4,45	-0,17
216	68	Tubulina, podjednostka alfa	Inne	0,75	1,66E-14	1,83E-31	8,37E-02	5,69	5,14	-0,55
217	47	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne	0,61	2,21E-15	2,89E-08	7,39E-01	3,17	3,41	0,24
218	60	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne	0,82	3,17E-34	1,05E-02	5,14E-08	3,45	3,54	0,09
219	54	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne	0,49	7,79E-14	3,37E-11	2,15E-03	3,40	3,62	0,22
220	25	Urydylotransferaza UTP-glukozy-1-fosforanu	Metabolizm węgla	0,65	1,58E-03	5,89E-01	3,00E-01	4,59	4,55	-0,03
221	86	Urydylotransferaza UTP-glukozy-1-fosforanu 1	Metabolizm węgla	0,76	0,00E+00	8,92E-01	2,23E-08	5,38	5,38	0,00
222	26	Urydylotransferaza UTP-glukozy-1-fosforanu	Metabolizm węgla	0,54	2,12E-04	5,95E-08	1,48E-01	4,75	4,37	-0,38
223	67	V-typ ATPaza	Transport elektronów	0,49	5,61E-20	2,01E-02	6,59E-04	4,44	4,39	-0,04
224	66	V-typ ATPaza, podjednostka A	Transport elektronów	0,76	7,41E-25	0,00E+00	2,13E-04	5,94	6,75	0,80
225	69	V-typ ATPaza	Transport elektronów	0,74	0,00E+00	2,75E-18	1,54E-01	6,22	6,00	-0,22
226	55	V-typ ATPaza, podjednostka A	Transport elektronów	0,57	2,36E-16	0,00E+00	5,60E-08	4,12	4,39	0,27
227	76	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	0,75	2,71E-41	6,71E-02	3,37E-01	5,93	5,91	-0,03
228	57	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	0,78	1,35E-26	7,61E-02	6,17E-02	5,15	5,11	-0,05
229	55	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	0,58	7,39E-20	9,00E-02	1,10E-04	5,43	5,40	-0,03
230	20	V-typ ATPaza, podjednostka C	Transport elektronów	0,86	1,14E-19	8,94E-04	8,66E-02	4,12	4,20	0,08
231	70	V-typ ATPaza	Transport elektronów	0,58	1,21E-18	5,97E-07	2,09E-04	4,74	4,63	-0,11
232	54	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,82	1,37E-25	4,88E-15	7,15E-06	4,25	4,71	0,46
233	62	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,75	2,08E-13	0,00E+00	1,14E-01	3,83	4,65	0,82
234	47	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,83	1,34E-31	0,00E+00	1,58E-04	4,33	4,58	0,25
235	61	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,74	4,43E-35	2,69E-02	1,06E-02	5,25	5,29	0,04
236	82	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,47	3,06E-29	1,40E-01	1,84E-01	4,05	4,02	-0,03
237	74	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,74	1,50E-32	1,26E-33	6,26E-12	4,30	3,81	-0,49
238	72	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0,47	7,59E-25	2,19E-08	8,23E-01	3,81	3,94	0,13

239	85	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,69	1,30E-33	4,07E-16	3,87E-04	4,62	4,80	0,17
240	41	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,78	1,36E-22	9,40E-02	5,36E-02	4,08	4,04	-0,04
241	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,71	2,45E-27	1,18E-01	6,97E-02	4,48	4,44	-0,04
242	73	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,48	2,82E-29	3,88E-05	5,79E-03	4,14	4,24	0,11
243	80	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,39	2,10E-17	5,69E-04	2,35E-01	4,00	4,10	0,10
244	34	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,41	5,54E-07	1,00E-08	1,52E-01	3,57	3,93	0,36
245	62	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,72	4,93E-36	0,00E+00	4,14E-06	4,04	4,22	0,17
246	80	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,72	0,00E+00	1,32E-03	1,11E-10	4,97	4,92	-0,06
247	81	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	1,66E-28	1,17E-15	7,63E-03	4,30	4,46	0,16
248	80	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,46	6,67E-16	1,71E-02	1,78E-02	4,40	4,34	-0,06
249	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,26	1,20E-08	7,86E-09	3,04E-01	3,39	3,23	-0,16
250	49	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,64	8,24E-19	4,49E-01	3,87E-06	3,34	3,32	-0,02
251	66	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,53	7,45E-14	6,63E-11	3,20E-04	3,36	3,15	-0,21
252	70	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,39	2,65E-13	3,62E-07	2,69E-02	4,28	4,43	0,15
253	75	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,74	0,00E+00	5,44E-16	1,47E-03	5,29	5,05	-0,24
254	37	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,48	8,48E-12	1,55E-10	2,68E-03	4,22	3,89	-0,33
255	72	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,49	8,46E-25	6,12E-02	9,60E-05	3,70	3,65	-0,05
256	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,55	8,93E-13	2,95E-01	1,02E-01	3,42	3,38	-0,04
257	42	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,54	8,64E-13	4,75E-01	6,52E-04	3,56	3,58	0,03
258	31	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	5,87E-10	5,17E-03	3,07E-02	3,46	3,36	-0,10
259	26	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,78	0,00E+00	1,11E-01	3,86E-03	3,62	3,58	-0,04
260	67	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,58	2,29E-24	6,00E-01	2,57E-06	3,98	3,99	0,02
261	51	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,78	2,05E-30	6,22E-01	6,05E-01	6,68	6,65	-0,03
262	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,49	1,69E-16	1,18E-23	2,44E-03	4,17	4,45	0,28
263	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,71	1,46E-28	6,33E-35	4,20E-04	4,12	3,65	-0,47
264	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,90	6,99E-40	2,12E-16	8,11E-03	3,75	3,44	-0,31
265	80	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,60	3,01E-23	4,16E-29	2,65E-03	3,43	3,87	0,44
266	33	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	5,58E-11	1,69E-02	9,89E-02	3,34	3,25	-0,09
267	70	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,45	7,27E-20	2,45E-13	2,49E-02	3,78	3,59	-0,18
268	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	0,00E+00	8,03E-01	4,08E-02	4,05	4,04	-0,01
269	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,75	0,00E+00	3,76E-35	1,10E-01	5,32	4,86	-0,46
270	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,57	1,51E-23	9,09E-12	2,02E-02	5,09	4,89	-0,20
271	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,75	0,00E+00	5,17E-07	3,27E-06	4,80	4,68	-0,12
272	28	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,89	2,47E-16	3,53E-17	4,77E-07	4,70	4,40	-0,31
273	66	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,55	1,32E-22	1,37E-14	1,20E-05	3,84	3,62	-0,22
274	22	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,65	3,62E-08	4,64E-07	1,20E-02	3,55	3,81	0,25
275	72	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,81	0,00E+00	1,37E-19	3,97E-06	4,91	5,09	0,18
276	70	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,77	1,50E-39	2,25E-05	7,95E-05	5,40	5,47	0,07
277	42	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,41	1,36E-12	2,27E-09	7,57E-02	4,58	4,86	0,28
278	79	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,79	5,61E-23	0,00E+00	3,84E-07	4,40	5,10	0,70
279	67	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,83	2,24E-40	1,63E-08	1,73E-02	4,40	4,51	0,11
280	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,55	2,61E-18	5,67E-02	8,59E-05	4,03	4,07	0,04
281	25	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,82	1,67E-15	2,68E-11	5,66E-03	4,62	4,49	-0,12
282	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,52	2,82E-15	3,24E-01	5,32E-02	4,00	3,96	-0,04
283	43	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,81	4,95E-20	1,50E-05	2,18E-03	4,36	4,17	-0,19
284	30	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,63	9,25E-13	3,59E-02	8,37E-01	3,52	3,58	0,05
285	32	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,78	4,82E-25	2,78E-15	5,28E-07	4,64	4,36	-0,28
286	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,65	1,36E-17	7,91E-07	3,50E-01	4,20	4,07	-0,13
287	52	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,60	1,77E-16	2,23E-04	1,15E-03	4,38	4,27	-0,11
288	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,75	4,19E-33	3,99E-27	5,34E-12	4,66	5,03	0,37
289	31	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,63	1,63E-15	2,96E-05	5,98E-02	3,98	4,07	0,08

290	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,58	8,59E-17	3,54E-12	1,86E-03	4,04	4,37	0,33
291	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,60	2,15E-27	9,04E-29	3,29E-05	4,18	4,61	0,43
292	79	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,45	2,73E-16	7,90E-01	6,14E-06	4,21	4,22	0,01
293	53	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,82	2,95E-30	1,55E-15	7,39E-01	4,04	4,35	0,31
294	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,68	3,96E-35	3,80E-39	1,16E-12	5,38	4,85	-0,53
295	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,64	2,86E-15	3,39E-15	2,01E-02	3,29	3,69	0,41
296	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,61	2,30E-33	1,00E-01	1,96E-04	3,60	3,55	-0,05
297	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	1,03E-33	2,41E-01	8,85E-01	3,59	3,56	-0,03
298	51	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,54	5,28E-20	3,34E-03	8,57E-02	3,90	3,80	-0,10
299	87	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,76	0,00E+00	7,16E-31	1,31E-01	4,32	4,57	0,25
300	55	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	9,49E-13	6,60E-02	6,66E-03	3,40	3,33	-0,07
301	73	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,80	1,03E-39	3,69E-04	3,03E-06	3,50	3,60	0,10
302	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,65	3,53E-17	7,33E-01	2,28E-09	3,60	3,61	0,01
303	68	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,65	9,44E-20	2,66E-15	6,18E-02	3,71	4,26	0,55
304	86	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	0,00E+00	9,03E-17	2,99E-05	5,90	5,78	-0,12
305	31	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,32	5,01E-10	1,54E-04	6,30E-03	5,39	5,59	0,21
306	28	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,26	2,99E-10	3,05E-02	4,59E-02	3,77	3,71	-0,05
307	84	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,53	2,35E-39	1,62E-01	2,19E-03	4,08	4,10	0,02
308	89	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,71	0,00E+00	1,35E-10	3,51E-01	5,06	5,18	0,12
309	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,49	8,05E-30	8,20E-01	2,77E-05	4,02	4,01	-0,01
310	81	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,66	0,00E+00	9,73E-04	4,06E-03	4,52	4,48	-0,05
311	88	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,47	6,28E-32	1,32E-03	1,22E-01	4,64	4,60	-0,04
312	68	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,61	2,84E-19	7,07E-17	2,11E-01	3,54	3,84	0,30
313	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,69	4,18E-32	1,58E-03	1,26E-08	4,48	4,42	-0,06
314	57	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,54	6,34E-25	2,81E-09	1,33E-01	4,03	3,91	-0,12
315	84	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,49	2,18E-35	5,47E-21	1,48E-06	4,00	4,23	0,23
316	36	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,78	4,18E-22	2,00E-15	1,35E-08	3,54	3,92	0,38
317	75	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,66	1,57E-13	4,85E-33	2,17E-04	3,40	3,84	0,44
318	82	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,64	6,54E-29	1,48E-36	3,63E-03	3,72	4,12	0,41
319	65	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,51	2,55E-35	5,78E-02	3,56E-01	3,95	3,98	0,04
320	79	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,79	0,00E+00	4,41E-22	9,48E-03	4,10	4,26	0,15
321	65	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,41	5,38E-15	2,00E-04	1,89E-01	3,37	3,25	-0,12
322	43	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	5,95E-13	4,35E-06	6,87E-03	3,17	3,31	0,13
323	73	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,56	2,61E-35	8,57E-01	7,27E-03	4,50	4,50	0,00
324	82	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,55	5,92E-33	1,00E-26	5,96E-02	3,77	4,01	0,24
325	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	3,64E-26	1,76E-13	4,73E-03	3,76	3,90	0,14
326	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,25	1,52E-10	3,62E-02	4,47E-01	3,76	3,71	-0,05
327	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,52	0,00E+00	4,26E-19	1,09E-07	5,86	6,05	0,19
328	45	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,30	1,35E-10	4,12E-07	8,85E-03	3,46	3,31	-0,15
329	42	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,44	9,93E-13	1,17E-09	6,75E-04	4,01	3,82	-0,19
330	44	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,37	9,65E-12	2,63E-05	1,03E-01	3,57	3,45	-0,13
331	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,50	7,04E-37	9,64E-01	3,97E-02	3,91	3,91	0,00
332	68	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,74	2,15E-39	2,61E-19	1,38E-04	3,99	4,20	0,21
333	61	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,80	1,75E-35	6,66E-16	2,94E-01	4,47	4,31	-0,15
334	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,64	0,00E+00	1,46E-01	1,72E-07	4,28	4,31	0,03
335	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,60	0,00E+00	9,08E-01	1,29E-06	4,30	4,30	0,00
336	65	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	3,69E-22	3,36E-03	4,10E-04	3,98	4,05	0,07
337	52	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,45	2,09E-09	3,66E-02	3,95E-02	3,72	3,64	-0,08
338	65	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,74	2,30E-25	3,53E-17	7,07E-17	3,87	4,39	0,53
339	63	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,58	1,28E-27	7,07E-17	1,63E-02	3,98	3,70	-0,28

340	36	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,53	5,06E-11	2,35E-11	1,03E-02	3,85	3,65	-0,20
341	26	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,85	3,53E-17	7,79E-03	1,85E-03	4,09	4,03	-0,06
342	46	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,51	1,91E-14	5,90E-01	2,00E-01	4,01	4,03	0,02
343	68	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,54	2,15E-23	1,09E-13	8,18E-05	4,97	4,78	-0,19
344	75	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	6,61E-35	3,06E-24	1,68E-06	5,20	5,00	-0,20
345	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,72	2,24E-41	3,28E-06	1,99E-03	4,33	4,41	0,07
346	72	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,48	3,66E-23	9,07E-01	1,78E-03	5,65	5,65	0,00
347	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,33	4,54E-15	2,29E-05	1,11E-01	3,78	3,61	-0,17
348	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,65	6,14E-24	3,77E-10	4,13E-03	3,76	3,58	-0,19
349	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,89	0,00E+00	7,85E-01	1,37E-02	4,62	4,62	-0,01
350	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	1,04E-37	6,74E-01	8,97E-03	5,23	5,24	0,01
351	61	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,71	2,19E-24	3,40E-01	1,62E-01	4,34	4,32	-0,02
352	63	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,74	1,01E-29	1,16E-02	1,92E-02	4,30	4,23	-0,07
353	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,55	5,51E-33	5,67E-02	2,70E-02	4,02	4,06	0,05
354	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,56	6,12E-11	3,91E-05	1,45E-01	4,03	4,19	0,16
355	36	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	2,21E-13	0,00E+00	8,59E-04	4,05	4,54	0,49
356	67	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,56	2,17E-16	6,28E-06	2,23E-01	4,65	4,56	-0,09
357	53	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,66	1,76E-24	6,23E-01	9,11E-01	4,22	4,19	-0,03
358	74	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,68	4,62E-33	6,38E-13	8,57E-04	4,94	4,75	-0,20
359	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,54	1,01E-16	4,22E-04	6,88E-05	4,28	4,17	-0,11
360	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,44	1,29E-14	7,57E-02	8,16E-01	3,55	3,47	-0,08
361	53	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,70	5,48E-26	2,05E-03	3,03E-04	4,48	4,40	-0,08
362	36	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,67	3,48E-12	1,69E-03	3,28E-03	3,53	3,61	0,08
363	25	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,92	2,99E-23	2,58E-04	5,33E-01	4,80	4,71	-0,09
364	44	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,82	0,00E+00	1,98E-08	1,27E-09	4,09	3,89	-0,20
365	70	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,66	6,32E-37	1,77E-07	2,92E-01	4,64	4,84	0,20
366	73	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,53	3,30E-21	2,63E-15	6,13E-04	4,24	4,41	0,17
367	35	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,66	3,07E-14	1,26E-09	2,50E-03	4,23	4,04	-0,19
368	78	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,69	1,08E-37	9,91E-05	2,01E-04	4,25	4,34	0,09
369	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,74	0,00E+00	1,99E-02	1,10E-02	5,67	5,74	0,08
370	84	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,59	5,35E-41	2,62E-10	1,04E-02	5,54	5,72	0,18
371	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,42	1,97E-22	1,64E-02	1,67E-02	3,95	3,85	-0,09
372	69	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	1,67E-38	5,01E-01	1,57E-01	5,53	5,50	-0,03
373	36	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,62	0,00E+00	2,12E-04	5,75E-04	5,07	4,94	-0,13
374	71	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,84	0,00E+00	9,03E-05	1,44E-02	5,14	5,23	0,09
375	54	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,52	2,70E-15	9,63E-02	3,74E-02	5,04	4,96	-0,08
376	34	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	0,00E+00	2,43E-01	5,65E-06	4,00	3,98	-0,02
377	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,75	4,67E-38	8,21E-04	3,46E-02	4,65	4,57	-0,09
378	78	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,40	5,67E-22	8,06E-04	1,08E-01	3,95	4,02	0,07
379	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,73	2,95E-33	1,94E-21	4,24E-05	4,33	4,58	0,25
380	61	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,43	2,44E-19	2,24E-13	1,36E-02	3,80	3,98	0,18
381	55	Niezidentyfikowane	Nieznana	0,52	2,67E-15	6,25E-03	3,37E-02	3,69	3,77	0,09

Efekt suszy, czyli różnica pomiędzy wartością poziomu akumulacji białka w warunkach suszy a wartością w warunkach kontrolnych był istotny statystycznie dla 225 białek (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego). Interakcje pomiędzy liniami populacji mapującej MCam a suszą były istotne statystycznie dla 115 białek (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego). Różnice w akumulacji 82 białek wykazały istotność statystyczną zarówno dla efektu suszy jak i dla efektu interakcji pomiędzy genotypem a suszą (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego) (Tab. 4.9).

Tab. 4.9. Klasyfikacja białek w odniesieniu do istotności zmian poziomu akumulacji pomiędzy warunkami stresu suszy i kontrolą (efekt suszy) oraz oddziaływań pomiędzy liniami populacji mapującej MCam i suszą (interakcja genotyp \times susza).

Efekt suszy	Interakcja genotyp \times susza		
	Nieistotny	Istotny	Suma
Nieistotny	123	33	156
Istotny	143	82	225
Suma	266	115	381

Spośród 225 białek, których zmiany poziomu akumulacji wykazały istotność statystyczną dla efektu suszy, 117 zwiększyło poziom akumulacji w warunkach deficytu wody, natomiast 90 charakteryzowało się spadkiem w poziomie akumulacji (Tab. 4.10). Najwyższy dodatni efekt suszy (efekt suszy ≥ 1.2) obserwowany był dla dwóch izoform białka szoku cieplnego o masie 16.9 kDa (nr białka wg Tab. 4.8: 9,11), białka należącego do rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop (P-loop NTP-aza) (168), mutazy bisfosfoglicerynianowej (16) i dehydrogenazy jabłczanowej (162). Wysoki dodatni efekt suszy ($0.8 \leq$ efekt suszy ≤ 1.0) charakteryzował następujące białka: syntaza S-adenozylometioninowa (199), białko odpowiadające na stres chłodu (80) i ATP-aza (224). Podwyższony poziom akumulacji mutazy bisfosfoglicerynianowej charakteryzował 90% badanych genotypów, a względna ilość tego białka zwiększyła się od 2 do 14-krotnie w korzeniach roślin poddawanych stresowi suszy w stosunku do kontroli. Białko szoku cieplnego 16.9 kDa, które wyróżniał wzrost poziomu ekspresji dla wszystkich badanych genotypów, zwiększyło swój profil akumulacji w granicach od 2 do 19-razy w stosunku do

kontroli. Najwyższym ujemnym efektem suszy (efekt suszy ≥ -0.5) charakteryzowały się enzymy związane z metabolizmem wtórnym: dwie izoformy amoniakolizazy fenyloalaniny (174,175) i *O*-metylotransferaza kwasu kawowego (71), oraz enzymy antyosydacyjne: peroksydaza askorbinianowa (144) i manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa (156). Ujemny efekt suszy wykazywała też fruktokinaza (108), proteasom 26S (19) i germina 8-5 (114). Amoniakolizaza fenyloalaniny wykazała najwyższy ujemny efekt suszy dla 85% badanych genotypów, a poziom jej akumulacji obniżony był średnio 2-3-krotnie w porównaniu do korzeni roślin kontrolnych. Wśród 115 białek, których zmiany profilu akumulacji były istotne statystycznie dla efektu genotyp \times susza, 56 białek charakteryzowało się wzrostem poziomu akumulacji, natomiast 55 białek cechował spadek akumulacji w warunkach deficytu wody. Najsilniejszy stopień korelacji obserwowano dla białek, których zmiany ekspresji posiadały najwyższy dodatni/ujemny poziom efektu suszy.

W celu sprawdzenia istotności odchylenia w proporcji pomiędzy ujemnym, nieistotnym i dodatnim efektem suszy dla kategorii funkcyjnych od tej samej proporcji dla wszystkich białek (suma obserwacji), przeprowadzono test zgodności χ^2 . Analiza statystyczna została wykonana dla grup z podziałem na funkcje biologiczne, w których wyróżniono liczbę białek większą niż 5. Proporcja pomiędzy ujemnym, nieistotnym i dodatnim efektem suszy wynosiła odpowiednio 90:174:117 (1:2:1,3). Na podstawie testu zgodności χ^2 dla wszystkich przedstawionych kategorii funkcyjnych, stwierdzono, że największym odchyleniem od proporcji średnich zmian (suma obserwacji) charakteryzowała się kategoria związana z mechanizmami obronnymi (1:2:2). W grupie tej obserwowano zwiększoną liczbę białek, których profil akumulacji uległ wzrostowi w warunkach suszy, w porównaniu do rozkładu proporcji sumy obserwacji. Dla pozostałych kategorii nie stwierdzono zmian w ujemnych, nieistotnych i dodatnich efektach suszy w odniesieniu do sumy obserwacji. Co oznacza, że dla tych kategorii funkcyjnych nie stwierdzono nadreprezentacji cech, które uległy zmianie pod wpływem działania suszy (Tab. 4.10).

Tab.4.10. Wpływ suszy na zmiany poziomu akumulacji białek reprezentujących poszczególne kategorie klasyfikacji funkcyjnej w korzeniach linii populacji mapującej MCam.

Funkcja biologiczna	Efekt suszy			
	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma
Mechanizmy obronne	28	38	38	103
Metabolizm węgla	12	17	21	50
Ekspresja genów	6	10	6	22
Transport elektronów	5	7	7	19
Metabolizm azotu	6	7	4	17
Metabolizm wtórny	5	2	2	9
Inne	4	6	2	12
Nieznane	24	89	37	150
Suma	90	174	117	381

Test zgodności χ^2 przeprowadzono także w przypadku interakcji genotyp x susza z uwzględnieniem efektu suszy. Stosunek proporcji genotyp x susza nieistotnych do istotnych statystycznie dla sumy obserwacji wynosił odpowiednio 1:2,5 (32:82 białek). Na podstawie testu zgodności dla kategorii funkcyjnych, w których zawierało się więcej niż 5 białek zauważono, że proporcje interakcji genotyp x susza najbardziej odbiegają w przypadku kilku kategorii funkcyjnych. Największym odchyleniem od proporcji średnich zmian w suszy wszystkich białek (suma obserwacji) charakteryzowała się kategoria związana z metabolizmem węgla (1:5), co wskazuje na większą w tej kategorii liczbę białek wykazujących istotne statystycznie zmiany wynikające z interakcji genotyp x susza (Tab. 4.11).

Tab. 4.11. Interakcja genotyp x susza z uwzględnieniem średnich wielkości efektów suszy w liniach populacji mapującej MCam dla poszczególnych kategorii klasyfikacji funkcyjnej białek.

Funkcja biologiczna	Interakcja genotyp x susza			Suma
	Nieistotna	Istotna		
		Efekt suszy		
		Ujemny	Dodatni	
Mechanizmy obronne	10	9	15	34
Metabolizm węgla	3	3	12	18
Ekspresja genów	2	0	2	4
Transport elektronów	0	1	4	5
Metabolizm azotu	5	3	3	11
Metabolizm wtórny	2	0	0	2
Inne	0	3	2	5
Nieznane	10	13	12	35
Suma	32	82		115

Analiza genotypów rodzicielskich, odnosząca się do 381 białek, których zmiany ekspresji były istotne statystycznie dla populacji MCam pokazała, że poziom akumulacji białek zarówno w warunkach suszy jak i w kontroli był w większej liczbie przypadków wyższy u odmiany Maresi niż w linii Cam/B1/CI (Tab. 4.12).

Tab. 4.12. Porównanie poziomu akumulacji białek w warunkach suszy i kontroli w genotypach rodzicielskich.

Poziom akumulacji białka	Susza	Kontrola
Wyższy w Maresi	52	33
Równy	279	247
Wyższy w Cam/B1/CI	13	16
Całkowita liczba białek	344	296

Wśród białek reagujących na stres suszy, liczba białek, które wykazały podwyższony poziom akumulacji (dodatni efekt suszy) była zbliżona u odmian Maresi i Cam/B1/CI. Podobnie, ilość białek charakteryzujących się obniżonym poziomem akumulacji (ujemny efekt suszy) nie różnicowała obu linii rodzicielskich. Ponadto zaobserwowano, że zarówno u odmiany Maresi jak i Cam/B1/CI liczba białek, które wyróżniał dodatni efekt suszy była bardzo bliska ilości białek wykazujących ujemny efekt suszy. Liczba białek o niezmiennym profilu akumulacji (nieistotny efekt suszy) była wyższa w linii Cam/B1/CI (Tab. 4.13)

Tab. 4.13. Klasyfikacja białek w odniesieniu do istotności zmian poziomu akumulacji w warunkach stresu suszy i kontroli u genotypów rodzicielskich.

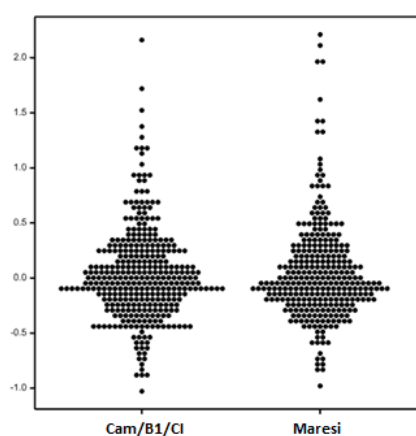
Efekt suszy	Maresi	Cam/B1/CI
Dodatni	33	34
Nieistotny	241	277
Ujemny	37	38
Suma	311	349

Odnosząc się do poszczególnych kategorii funkcyjnych białek, można zauważyć, że w większości przypadków oba genotypy rodzicielskie wykazują zbliżony liczbowy rozkład białek wykazujących ujemny, nieistotny i dodatni efekt suszy. Na podstawie test zgodności χ^2 dla kategorii zawierających więcej niż pięć białek (wszystkie kategorie) zaobserwowano, że białka pełniące funkcje obronne u linii CamB1/CI wykazują pewne odchylenie w stosunku do liczby białek o ujemnym, nieistotnymi i dodatni efekcie suszy u odmiany Maresi (Tab. 4.14). Wartości akumulacji białek dla odmian rodzicielskich są dostępne w materiałach dodatkowych (Tab. S1).

Tab. 4.14. Wpływ suszy na zmiany poziomu akumulacji białek reprezentujących poszczególne kategorie klasyfikacji funkcyjnej w korzeniach odmian rodzicielskich.

Funkcja biologiczna	Efekt suszy							
	Maresi				Cam/B1/CI			
	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma
Mechanizmy obronne	7	64	11	82	10	65	22	97
Metabolizm węgla	5	30	6	41	5	29	7	41
Ekspresja genów	2	12	3	17	3	14	2	19
Transport elektronów	1	12	2	15	1	13	2	16
Metabolizm azotu	7	7	2	16	2	15	0	17
Metabolizm wtórny	3	7	1	11	5	5	0	10
Inne	1	7	1	9	1	7	1	9
Nieznane	7	102	12	121	7	119	14	140
Suma	33	241	37	311	34	278	38	349

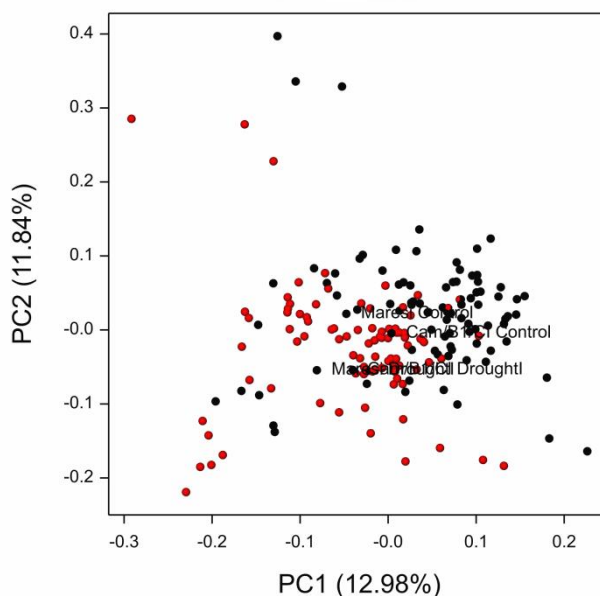
Z rozkładu efektów suszy, dla korzeni odmian rodzicielskich wynika, że odmianę Maresi cechuje obecność kilku białek o silnie dodatnich efektach suszy, których zmiany w odpowiedzi na stres suszy nie były obserwowane w linii Cam/B1/CI. Do białek tych należą m.in.: syntaza *S*-adenozylometioninowa (199), białko regulatorowe z rodziny 14-3-3 (1), V-typ ATP-aza (224) (Ryc. 4.10; Tab. 4.8, Tab. S1).



Ryc.4.10. Rozkład efektu suszy dla profili białkowych obserwowanych dla genotypów rodzicielskich.

Dla odmian rodzicielskich i linii populacji mapującej przeprowadzona została analiza współrzędnych głównych (PCO, ang. *Principal Coordinates Analysis*). Analizę wykonano dla wszystkich badanych genotypów jęczmienia w warunkach suszy i kontroli (Ryc. 4.11), dla wszystkich kategorii funkcyjnych (Ryc. 4.12) oraz dla efektów suszy (Ryc. 4.13).

Analiza PCO przeprowadzona dla wszystkich białek zidentyfikowanych w badanych liniach populacji mapującej i odmianach rodzicielskich wykazała, że najsilniej dodatnio skorelowane względem pierwszej współrzędnej są następujące białka: amoniakoliza fenyloalaniny (175) i zależna od DNA polimeraza RNA II (96). Największe zróżnicowanie genotypów w suszy i kontroli obserwowano dla mutazy fosfoglicerynianowej (182), białka szoku cieplnego 70 kDa (32), syntazy glutaminianowej (119), mitochondrialnej podjednostki ATP-azy (128) i czynnika elongacyjnego Tu (99), które stanowiły białka najsilniej skorelowane ujemnie z pierwszą współrzędną. Względem drugiej współrzędnej ujemną korelację wykazały białka: peroksydaza askorbinianowa (48), białko późnej embriogenezy(79) i syntaza ATP (plamka nr 60).



Ryc. 4.11. Analiza współrzędnych głównych. Genotypy rodzicielskie i linie populacji mapującej MCam przedstawione zostały na płaszczyźnie dwóch współrzędnych głównych obliczonych dla poziomu akumulacji białek w warunkach niedoboru wody i w warunkach kontrolnych. Kolor czerwony przedstawia genotypy w warunkach suszy, kolor czarny genotypy w warunkach kontrolnych. 1 - odmiany rodzicielskie w warunkach kontrolnych, 2 – odmiany rodzicielskie w warunkach suszy.

Analiza współrzędnych głównych w odniesieniu do profilu akumulacji białek należących do określonych kategorii funkcyjnych, wykazała, że badane genotypy cechuje zróżnicowanie pomiędzy warunkami suszy i kontroli i różnią się one zarówno pod względem pierwszej i drugiej współrzędnej głównej. Istotne zróżnicowanie zauważono w kategoriach: mechanizmy obronne, metabolizm węgla, ekspresja genów, metabolizm wtórny i inne.

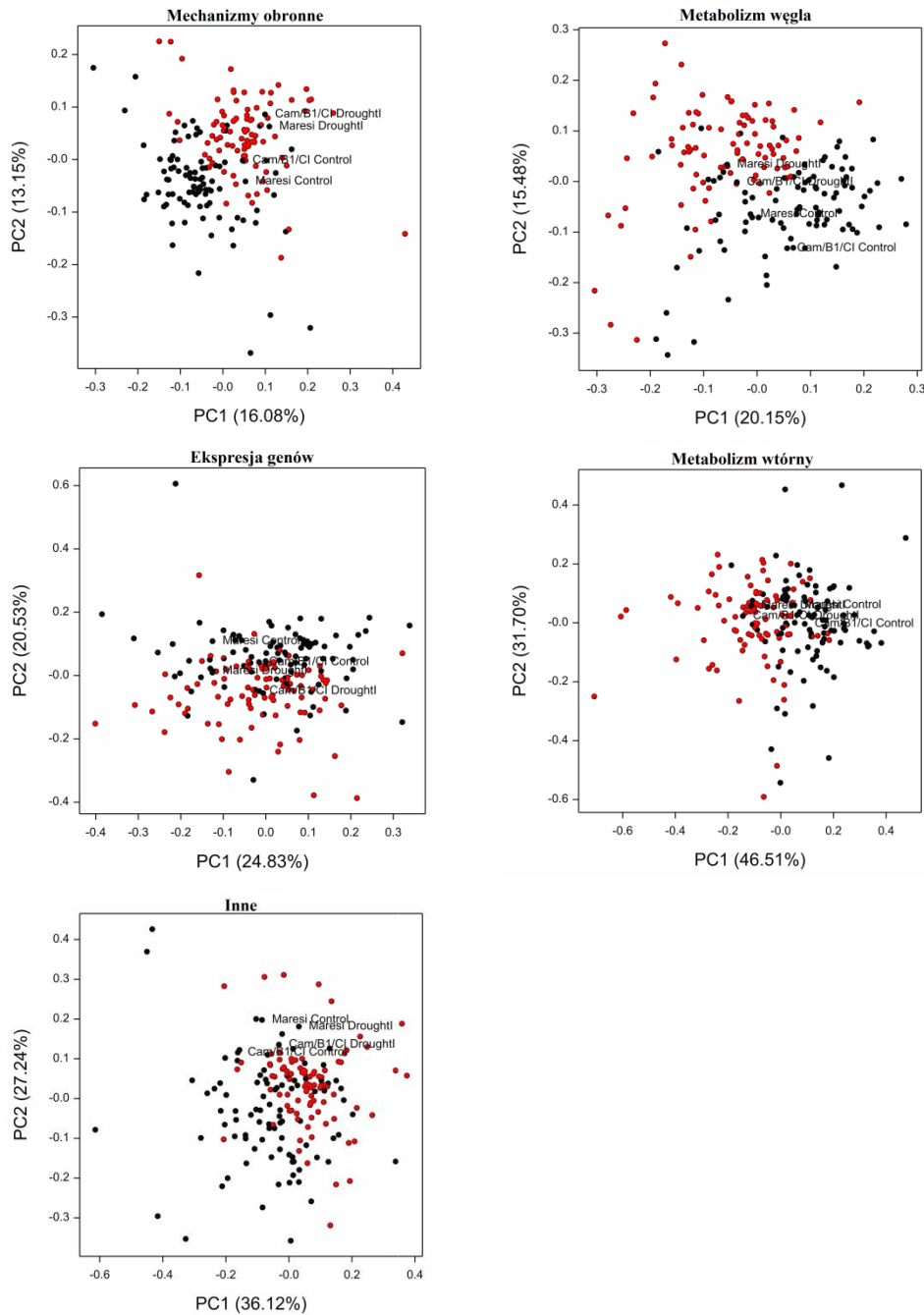
W kategorii mechanizmy obronne o różnicach pomiędzy suszą i kontrolą badanych genotypów pod względem pierwszej współrzędnej decydowały następujące białka: białka szoku cieplnego o masach 16.9 kDa, 17.6 kDa i 70 kDa (9,14,32), reduktaza dehydroaskorbinianowa (91), syntaza glutaminianowa (119) i dwie izoformy peroksydazy askorbinianowej (138,142). Białka te wyróżniały się silnie ujemną korelacją z pierwszą współrzędną i charakteryzowały się zwiększonym poziomem akumulacji w warunkach deficytu wody. Plamka numer 9 reprezentująca na elektroforegramach białko szoku cieplnego o masie 16.9 kDa wykazywała bardzo wysoki dodatni poziom efektu suszy, równy 1.73. Największe zróżnicowanie genotypów pod względem drugiej współrzędnej, wykazujące silnie ujemną korelację obserwowano dla białka późnej embriogenezy (79) i reduktazy dehydroaskorbinianowej (89).

Wśród białek należących do grupy funkcyjnej związanej z przemianami metabolicznym węgla najsilniej ujemnie skorelowanymi z pierwszą współrzędną były: fruktokinaza (108), dwie izoformy mutazy bisfosfoglicerynianowej (15,16) i dehydrogenaza jabłczanowa (162). Natomiast najsilniej dodatnio skorelowanym białkiem z drugą współrzędną była lipoksygenaza (147). Mutaza bisfosfoglicerynianowa i dehydrogenaza jabłczanowa charakteryzowały się wysokim dodatnim poziomem efektu suszy, równym odpowiednio 1.45 i 1.23. W obrębie białek związanych z regulacją ekspresji genów dodatnią korelacją z drugą współrzędną wyróżniały się białko wiążące nukleotydy guaniniowe (127) i białko należące do kompleksu białek GINS (93). Natomiast białkiem różnicującym genotypy, które charakteryzowało się silnie ujemną korelacją z pierwszą współrzędną był czynnik inicjacji translacji 4A (103). W grupie białek związanych z metabolizmem wtórnym najsilniejszą dodatnią korelację względem pierwszej i drugiej współrzędnej wykazywały białka: *O*-metylotransferaza kwasu kawowego (71) i dwie izoformy amoniakolizy fenyloalaniny (174,175).

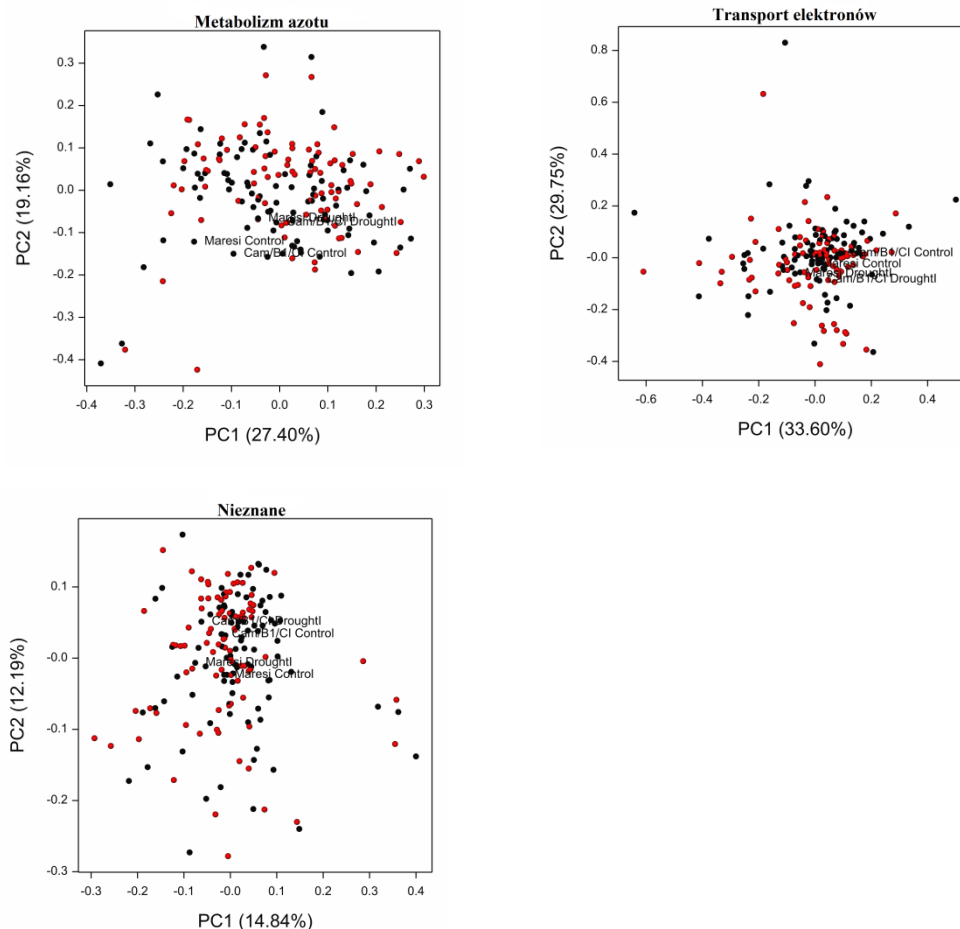
W przypadku białek, które sklasyfikowane zostały do grupy funkcyjnej określanej jako inne, najwyższy dodatni poziom korelacji z pierwszą współrzędną różnicującą badane genotypy cechował białko z rodziny formin (42). Dla pozostałych grup funkcyjnych nie

zaobserwowano znaczących zmian w obrębie badanych linii wzrastających w warunkach deficytu wody i w warunkach kontrolnych.

A

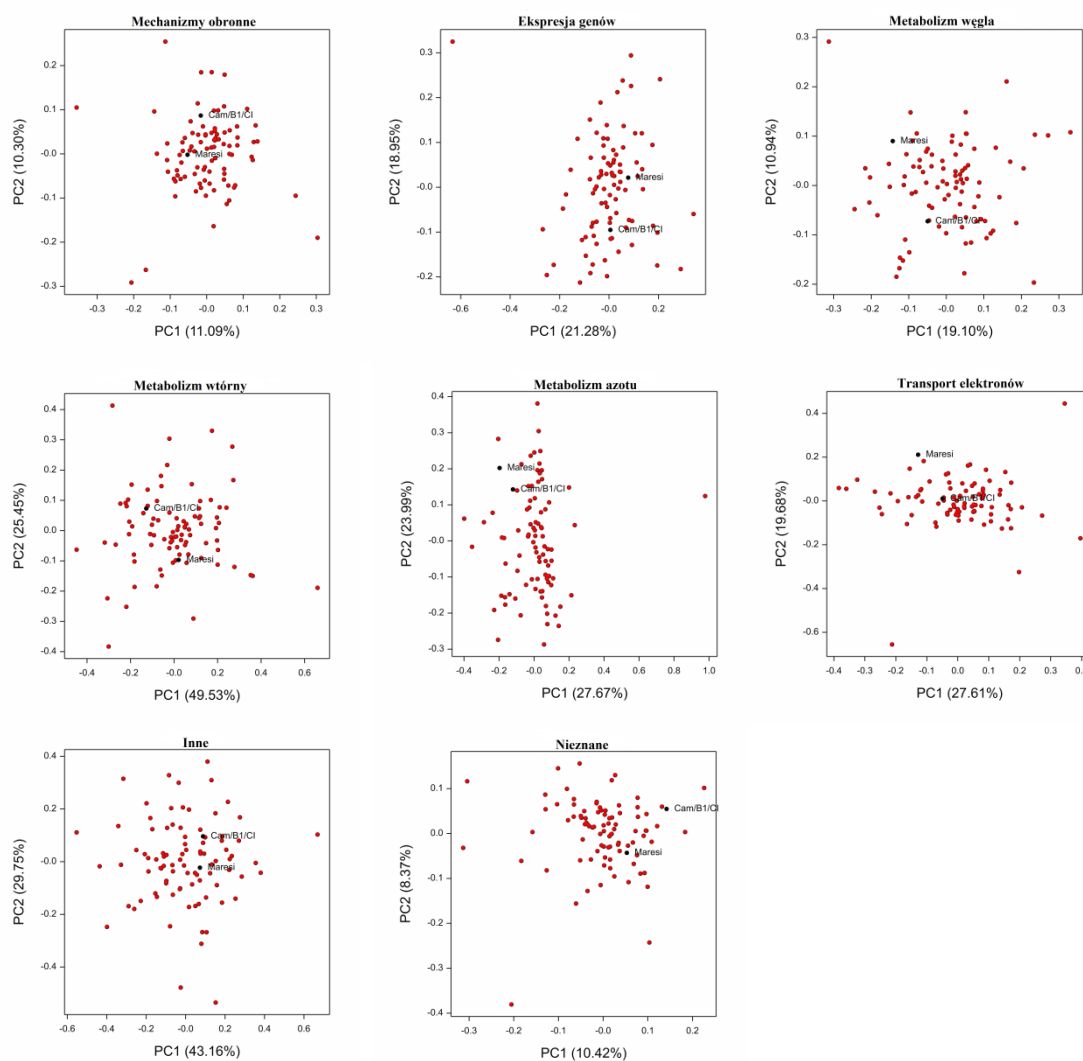


B



Ryc. 4.12. Analiza współrzędnych głównych dla sklasyfikowanych grup funkcyjnych, które A - wykazywały zróżnicowanie pod względem dwóch współrzędnych, B - nie wykazywały zróżnicowanie pod względem dwóch współrzędnych. Odmiany rodzicielskie i linie populacji mapującej M_{Cam} przedstawione zostały na płaszczyźnie dwóch pierwszych współrzędnych głównych obliczonych dla poziomu akumulacji białek w warunkach niedoboru wody i warunkach kontrolnych. Kolor czerwony przedstawia genotypy w warunkach suszy, kolor czarny przedstawia genotypy w warunkach kontrolnych. 1- odmiany rodzicielskie w warunkach kontrolnych, 2 – odmiany rodzicielskie w warunkach suszy.

Analiza PCO dla efektu suszy pokazała, że odległości pomiędzy genotypami rodzicielskim we wszystkich kategoriach funkcyjnych są niewielkie, co wskazuje na ich niski poziom zróżnicowania. W przypadku populacji mapującej widoczny jest większy rozrzut linii, co może świadczyć o wyższym stopniu ich zróżnicowania. W większości kategorii funkcyjnych genotypy zróżnicowane są względem obu współrzędnych głównych. Natomiast w kategorii metabolizm azotu zmienność widoczna jest względem drugiej współrzędnej głównej.



Ryc. 4.13. Analiza współrzędnych głównych dla efektów suszy. Linie populacji mapującej MCam i odmiany rodzicielskie przedstawione zostały na płaszczyźnie dwóch pierwszych współrzędnych głównych, obliczonych dla poziomu akumulacji białka w warunkach stresu suszy i kontroli.

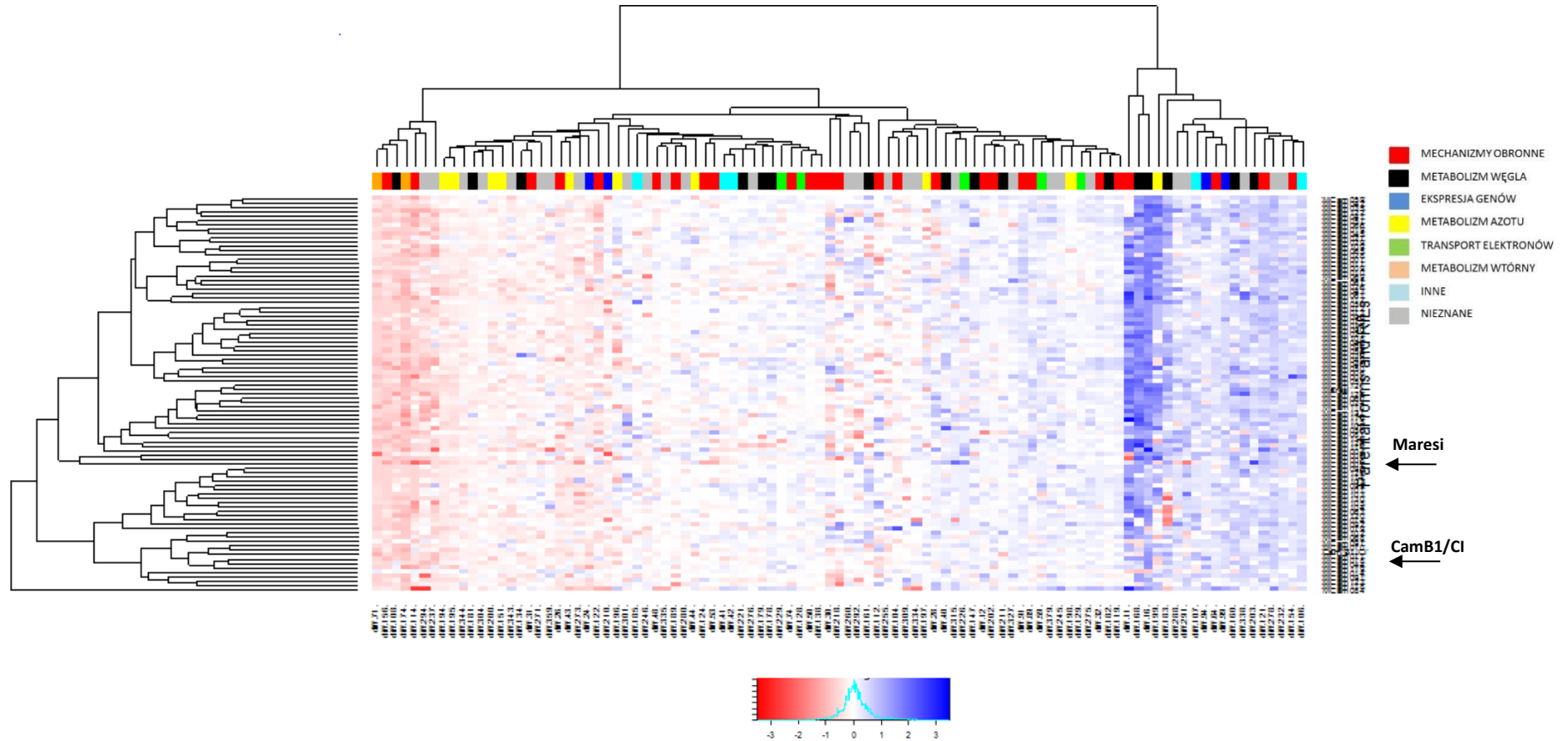
Grupowanie hierarchiczne jest jedną z wielowymiarowych metod statystycznych wykorzystywanych w badaniach proteomicznych, która pozwala na wizualizację dużej ilości uzyskiwanych danych. Dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne wykonano metodą średnich odległości pomiędzy obiektami w skupieniach (UPGMA, ang. *unweighted paired group average linkage*) na podstawie odległości euklidesowej. Z grupy 115 białek o statystycznie istotnej interakcji genotyp \times susza, do analizy skupień wybrano 97 białek, które występowały w przynajmniej 50 liniach badanej populacji mapującej. Uzyskane wyniki grupowania hierarchicznego przedstawiono w postaci mapy cieplnej oraz dendrogramów, z uwzględnieniem kategorii klasyfikacji funkcjonalnej białek (Ryc. 4.14, Ryc. 4.15) (ryciny w większej rozdzielczości umieszczono na płycie CD). Białka pogrupowano zgodnie z ich poziomem akumulacji w każdej badanej linii, dzięki czemu możliwe było znalezienie różnic i podobieństw w profilu akumulacji pomiędzy grupami białek i jednocześnie pomiędzy różnymi genotypami roślin.

W obrębie mapy cieplnej widoczny jest podział białek na trzy główne grupy: białka o dużych ujemnych efektach suszy (kolor czerwony), białka o ujemnych i dodatnich lecz słabych efektach suszy (środkowa część mapy) oraz białka o dużych dodatnich efektach suszy (kolor niebieski) (Ryc. 4.13). Do grupy białek, wyróżnionych przez najwyższy dodatni efekt suszy należą: białko szoku cieplnego 16.9 kDa (11), białko należące do rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop (P-loop NTP-aza) (168), mutaza bisfosfoglicerynianowa (16) i dehydrogenaza jabłczanowa (162) (efekt suszy ≥ 1). Syntaza S-adenozylometionina (199), dwa białka z rodziny COR (80,79), ATP-aza (224) i transferaza S-glutationowa (121) także charakteryzowały się wysokim efektem suszy (efekt suszy ≥ 0.5). Wśród białek o najwyższym ujemnym efekcie suszy znalazły się: enzymy antyoksydacyjne – manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa (156), peroksydaza askorbinianowa (144), białka związane z metabolizmem wtórnym - O-metylotransferaza kwasu kawowego (71), dwie izoformy amoniakolizy fenyloalaniny (174,175), białka obronne - białko należące do rodziny germin (114), proteasom 26S (19) oraz kluczowy enzym procesu glikolizy – fruktokinaza (108) (Tab. 4.8, Ryc. 4.13).

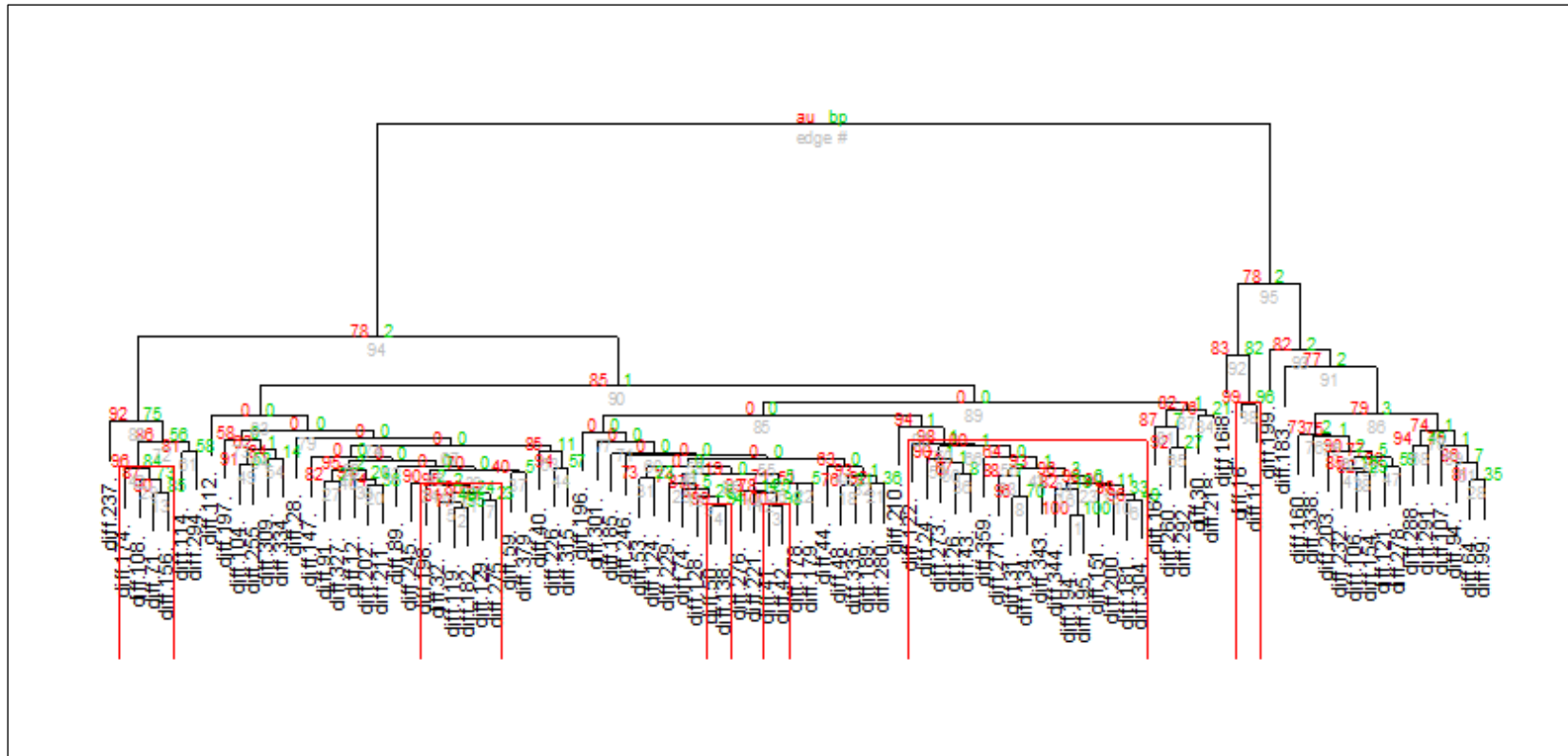
Wygenerowane dendrogramy wyraźnie różnicują zidentyfikowane białka na dwie zasadnicze grupy. W obrębie tych grup wyselekcjonowano podgrupy białek, które reagują w taki sam sposób na zastosowany stres suszy (Ryc. 4.15). Wśród wyznaczonych sześciu grup, grupy 1 i 5 zawierają białka, których zmiany poziomu akumulacji cechuje ujemny efekt suszy, natomiast zmiany akumulacji białek reprezentujących pozostałe grupy charakteryzuje dodatni efekt suszy. W grupie pierwszej znajdują się cztery z ośmiu białek,

które wykazują najwyższy ujemny efekt suszy (71,156,174,108) (Tab. 4.16). Dwa z nich – amoniakoliza fenyloalaniny i *O*-metylotransferaza kwasu kawowego należą do kategorii funkcyjnej związanej z metabolizmem wtórnym. Natomiast do grupy szóstej należą dwa z czterech białek wyróżnionych przez najwyższy dodatni efekt suszy, białko szoku cieplnego sHSP16.9 (11) i mutaza bisfosfoglicerynianowa (16). W grupie piątej występują cztery białka, których funkcje związane są z metabolizmem aminokwasów. Natomiast grupa czwarta to dwie izoformy aktyny (Tab. 4.16).

Na dendrogramie grupującym poszczególne linie według ich odpowiedzi na suszę, także można zaobserwować podział na dwie główne grupy genotypów (Ryc.4.16). Odmiany rodzicielskie znajdują się w różnych grupach, wokół których skupione są poszczególne linie populacji mapującej. Zastosowanie odpowiednich metod statystycznych pozwoliło na wyodrębnienie trzech podgrup linii, które w warunkach stresu cechuje statystycznie taki sam charakter odpowiedzi. W jednej z tych grup znajduje się odmiana rodzicielska Maresi wraz z 6 liniami MCam. Zastosowana metoda analizy danych wykazała indywidualny, w porównaniu do pozostałych linii, charakter odpowiedzi na stres linii 84. Co ciekawe, linia ta charakteryzuje się największą liczbą białek wykazujących zmiany w poziomie akumulacji w odpowiedzi na suszę w obrębie całej populacji mapującej MCam. Przeprowadzona analiza skupień pokazała, że różnice pomiędzy badanymi genotypami związane są przede wszystkim z różnicami w intensywności zmian profilu akumulacji poszczególnych białek, a nie z kierunkiem tych zmian, co sugerować może o bardzo konserwatywnej odpowiedzi proteomu korzenia na niedobór wody.



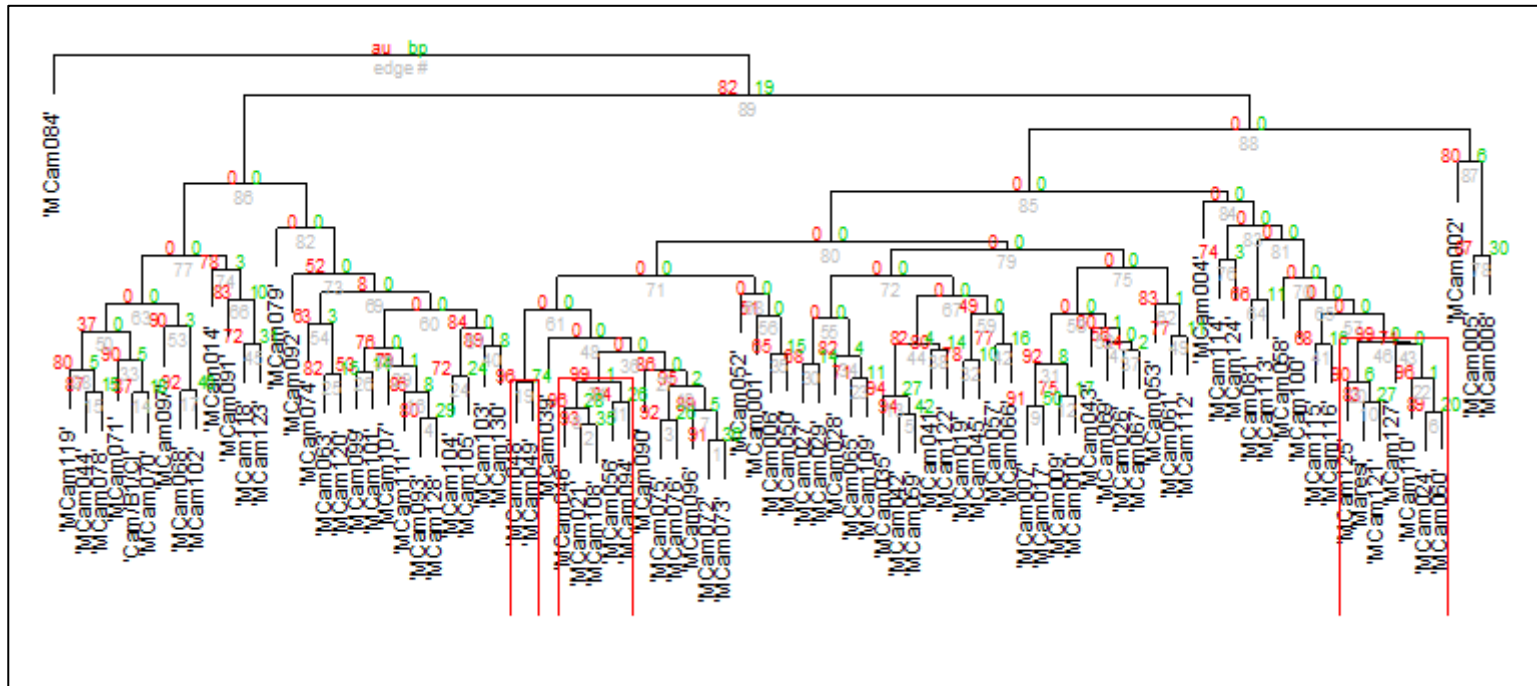
Ryc. 4.14. Mapa ciepła przedstawiająca 97 białek, które wykazały istotną statystycznie interakcję genotyp \times susza. W kolumnach przedstawione są białka zgodnie z wielkością efektu suszy, w wierszach przedstawione są linie populacji mapującej i genotypy rodzicielskie. Strzałkami wyróżniono odmiany rodzicielskie. Kolor czerwony – oznacza spadek poziomu akumulacji (ujemny efekt suszy), kolor niebieski – wzrost poziomu akumulacji (dodatni efekt suszy).



Ryc. 4.15. Dendrogram przedstawiający 97 białek, wykazujących istotne statystycznie zmiany poziomu akumulacji w obrębie linii populacji mapującej i genotypów rodzicielskich, które stanowią statystycznie odrębne grupy pod względem reakcji na suszę.

Tab.4.16. Białka sklasyfikowane w grupy, które wykazują zbliżony charakter odpowiedzi na stres suszy. Kolorem szarym zaznaczono białka należące do tych samych kategorii funkcyjnych.

GRUPA 1		GRUPA 4		GRUPA 5	
156	Manganiowa dysmutaza ponadtlenkowa	41	Aktyna 1	122	Transferaza S-glutationowa
71	O-metylotransferaza kwasu kawowego	42	Aktyna 2	24	Białko rybosomalne 30S
108	Fruktokinaza			273	Niezidentyfikowane
74	Amoniakoliza fenylalaniny			26	Białko 60kDa indukowane jasmonionami
				43	Fosforybulotransferaza adeninowa
GRUPA 2		GRUPA 6		359	Niezidentyfikowane
196	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	16	Mutaza bisfosfoglicerynianowa	271	Niezidentyfikowane
32	Białko szoku cieplnego 70 kDa	11	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	31	Białko szoku cieplnego 70 kDa
119	Syntaza glutaminianowa			304	Niezidentyfikowane
182	Mutaza fosfoglicerynianowa			32	Białko szoku cieplnego 80 kDa
129	ATP-aza, podjednostka alfa			134	Dehydrogenaza cytrynianowa
275	Niezidentyfikowane			343	Niezidentyfikowane
GRUPA 3				194	Syntaza S-adenozylometioninowa
50	Peroksydaza askorbinianowa			195	Syntaza S-adenozylometioninowa
38	Hydrolaza akonitowa			151	Syntaza S-adenozylometioninowa
				200	Dekarboksylaza S-adenozylometioninowa
				181	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa



Ryc. 4.16. Dendrogram przedstawiający linie populacji mapującej M Cam i genotypy rodzicielskie, uszeregowane w grupy, wykazujące taki sam charakter odpowiedzi na stres suszy.

5. DYSKUSJA

Susza jest jednym ze stresów abiotycznych, który stanowi ogromne zagrożenie dla bezpieczeństwa światowej gospodarki żywnościowej. Prognozy klimatyczne na przyszłe lata wskazują, że problem niedoboru opadów będzie się pogłębiał, co skutkować będzie wzrostem zapotrzebowania na wodę w rolnictwie. Z uwagi na to, że woda jest zasobem wyczerpywalnym, a klimat ulega ociepleniu istnieje konieczność rozwoju uprawy roślin w kierunku odmian odpornych na suszę. W celu wsparcia postępu biotechnologicznego i zaspokojenia potrzeb żywieniowych wciąż rosnącej populacji ludzkiej konieczne jest poznanie molekularnych mechanizmów odporności roślin na suszę i rozwijanie nowych strategii krzyżowania i selekcji ulepszonych odmian roślin uprawnych. Stosowane dotychczas klasyczne metody selekcji, oparte na obserwacjach wizualno-morfologicznych są niewystarczające do szybkiego uzyskiwania odmian dostosowanych do wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiska. Wzbogacenie tradycyjnego podejścia o nowe metody doboru materiału wyjściowego do krzyżowań i o techniki selekcji oparte na wiedzy o genomie oraz determinantach jakości i ilości plonu przyczyni się do uzyskiwania większej stabilności plonowania, niezależnie od warunków atmosferycznych, w znacznie krótszym czasie. Przykład może stanowić wykorzystanie hodowli wspomaganej markerami genetycznymi (MAB, ang. *Marker-Assisted Breeding*). Uzupełnienie markerów genetycznych danymi uzyskanymi z innych poziomów molekularnych m.in. proteomu, czy metabolomu, może przyczynić się do poszerzenia wiedzy dotyczącej mechanizmów odpowiedzi roślin na stres suszy i zidentyfikowania większej liczby markerów związanych z deficytem wody.

Mechanizmy odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe nie są jak dotąd dobrze poznane. Szczególnie problematyczny wydają się być stres suszy, który związany jest z pojawieniem się innych czynników stresowych, takich jak: wysokie temperatury, podwyższone zasolenie, czy promieniowanie ultrafioletowe. Ponadto u przypadku deficytu wody ważny jest moment zaistnienia stresu, który w zależności od stanu rozwojowego rośliny może w różny sposób wpływać na przebieg procesów metabolicznych, tym samym aktywując różne mechanizmy odporności. W celu przetrwania niekorzystnych warunków środowiskowych rośliny rozwinęły mechanizmy odpowiedzi, które uruchamiane są na różnych poziomach organizacji komórki. Na poziomie molekularnym dochodzi m.in. do

syntezy, akumulowania oraz zwiększonej aktywności specyficznych białek, mogących pełnić różnorakie funkcje w komórkach roślinnych. Ze względu na to, że białka stanowią główne nośniki aktywności biologicznej poznanie zmian, którym podlegają pod wpływem działania stresu może przyczynić się do poznania molekularnego podłoża odporności roślin na niekorzystny czynnik środowiskowy. Wyselekcjonowanie białek będących potencjalnymi markerami odporności na stres suszy jest zatem dla naukowców i hodowców ważnym wyzwaniem, które może mieć ogromny wpływ na przyszłość efektywniejszej hodowli roślin. Jednakże biorąc pod uwagę dużą zmienność proteomu oraz ograniczenia eksperymentalne nie należy ono do zadań łatwych. Ze względu na czasochłonność i złożoność metodyki stosowanej w analizach proteomicznych, większość badań prowadzonych jest zazwyczaj na zaledwie kilku genotypach roślin. Zbyt mała liczba obiektów użytych w eksperymentach sprawia, że wyniki nie odzwierciedlają statystycznie istotnych interakcji zachodzących pomiędzy białkami i genotypami. Badania na kilku kontrastujących genotypach mogą prowadzić do identyfikacji białek, których zmiany profilu akumulacji wynikają z różnic w pochodzeniu badanych odmian, a niekoniecznie stanowią wskaźniki odpowiedzi na zaistniały czynnik stresowy. Przeprowadzone w ten sposób doświadczenia mogą też ujawnić pewną liczbę białek, które są jedynie wskaźnikami przemian metabolicznych i procesów degeneracyjnych zachodzących na skutek działania stresu. Znacznym ułatwieniem dla poszukiwania potencjalnych biomarkerów może być badanie dużej liczby blisko spokrewnionych osobników, takich jak populacje mapujące. Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i osobników potomnych, będących mieszaniną cech genetycznych daje możliwość globalnego, a zarazem wiarygodnego spojrzenia na zmiany poziomu białek w odniesieniu do dużej populacji, a zastosowanie odpowiednich metod statystycznej oceny danych umożliwia odróżnienie kandydatów markerów białkowych od białek, które nie wykazują interakcji pomiędzy genotypem a suszą. Należy pamiętać o tym, że efektywna hodowla związana jest z uzyskiwaniem roślin odpornych na stres, które będą charakteryzowały się stabilnością plonowania w niekorzystnych warunkach atmosferycznych. Dlatego białka, będące potencjonalnymi markerami suszy muszą w następnym kroku zostać skorelowane ze zmierzonymi cechami ilościowymi, odnoszącymi się do wielkości i jakości plonu, oraz z danymi uzyskanymi na innych poziomach molekularnych, w celu określenia cech, z którymi zmiana akumulacji określonego białka mogłaby być związana.

Opublikowane do tej pory wyniki badań proteomu roślinnego podczas odpowiedzi na stres abiotyczny, w tym suszę, obejmują zazwyczaj dane uzyskane jedynie dla kilku

kontrastujący genotypów. Brak jest wyników projektów analizujących proteomy większej liczby osobników reprezentujących populacje mapujące odpowiadających na stres abiotyczny. Dodatkowo zdecydowana większość opublikowanych do tej pory eksperymentów skupiała się na analizie zmian proteomu liści, natomiast znacznie mniej uwagi poświęcono korzeniom. Tematyka niniejszej pracy doktorskiej dotyczy zmian proteomu korzeni siewek populacji mapującej jęczmienia w warunkach niedoboru wody, co stanowi dotychczas nieporuszone zagadnienie badawcze. Eksperymenty prowadzone były na trzech odmianach europejskich jęczmienia (Maresi, Sebastian, Stratus), na syryjskiej linii hodowlanej Cam/B1/CI i 89 liniach populacji mapującej MCam. Analizę zmian proteomu wykonano z wykorzystaniem dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, jako techniki separacji białek. Identyfikację białek przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru mas typu MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF. Warunki suszy, które zainicjowano w stadium 3-go liścia wywołały zmiany proteomu wszystkich badanych genotypów jęczmienia, co sugeruje, że niedobór wody ma ogromny wpływ na poziom akumulacji białek, a tym samym na dalszy rozwój młodych roślin. Modyfikacje poziomu białek w odpowiedzi na deficyt wody były różne dla poszczególnych odmian, co widoczne jest w zestawieniu białek wykazujących zmiany profilu dla przynajmniej dwóch z badanych genotypów. Pomimo tego, że profil akumulacji reagujących białek był różny, to kierunek zmian w większości przypadków był podobny, z różnicami w intensywności wzrostu czy spadku konkretnego białka. Wszystkie zidentyfikowane białka reagujące na suszę sklasyfikowano w zależności od pełnionych funkcji w następujące grupy funkcyjne: białka związane z mechanizmami obronnymi, zaangażowane w przemiany metaboliczne węgla i azotu, związane z regulacją ekspresji genów, transportem elektronów/jonów, czy metabolizmem wtórnym. Analizy pojedynczych genotypów i poszukiwanie różnic w profilu białek pomiędzy warunkami suszy i kontrolnymi przeprowadzono zgodnie ze standardową procedurą w programie Image Master. Jednakże wyselekcjonowanie białek różnicujących warunki suszy i kontroli, oraz wykazujących istotne różnice pomiędzy liniami całej populacji mapującej jest trudne i w zasadzie niemożliwe do przeprowadzenia w tym programie. Przeanalizowanie wyników uzyskanych dla tak dużej liczby genotypów wymagało wykorzystania odrębnego podejścia – analizy niecelowanej i zastosowania dodatkowego oprogramowania oraz metod analizy statystycznej. Przeprowadzona analiza ujawniła, że większość białek wykazywała istotne statystycznie zmiany w poziomie akumulacji ze względu na przynajmniej jeden z badanych czynników, czyli wpływu niedoboru wody, różnic genotypowych, bądź współdziałania obu tych czynników.

5.1. Białka obronne

Największa liczba zidentyfikowanych białek o istotnych efektach suszy należy do grupy związanej z mechanizmami obronnymi, w której znajdują się: białka szoku cieplnego, enzymy antyoksydacyjne, czy enzymy uczestniczące w syntezie osmolitów. Zidentyfikowane białka reprezentujące tę kategorię funkcyjną stanowią prawie połowę z wszystkich białek reagujących na zadany stres środowiskowy. W analizie celowanej w zdecydowanej większości białka te wykazywały zwiększony poziom akumulacji, a w analizie niecelowanej aż 64 z 103 białek, wykazywało istotny statystycznie efekt suszy. O uruchomieniu przez roślinę mechanizmów obronnych świadczy fakt, że proporcja w liczbie białek obronnych wykazujących dodatni efekt suszy do białek o efekcie ujemnym jest wyższa niż w przypadku innych kategorii funkcyjnych. Analiza współrzędnych głównych PCO dla białek z tej kategorii wykazała znaczące różnice pomiędzy poziomem akumulacji białek w warunkach deficytu wody, a warunkach kontrolnych. Jednakże wykres PCO dla efektu suszy nie ujawnia istotnego zróżnicowania pomiędzy liniami populacji mapującej i genotypami rodzicielskimi, co wskazuje na wysoce konserwatywną odpowiedź proteomu korzenia. Można jednak zauważyć, że 25 białek wykazuje istotne statystycznie zmiany związane z współdziałaniem dwóch czynników: niedoboru wody i różnic genotypowych.

W odpowiedzi na niedobór wody rośliny rozwinęły mechanizmy obronne, związane z syntezą i akumulowaniem określonych białek obronnych, pozwalające na utrzymanie stanu homeostazy pomimo działania stresu oraz niwelowania negatywnych skutków stresu. Białka szoku cieplnego (HSP, ang. *Heat Shock Proteins*) stanowią grupę molekuł, które syntetyzowane i akumulowane są w optymalnych stężeniach w warunkach fizjologicznego wzrostu roślin. Poziom ich stężenia w komórce ulega znaczącym zmianom na skutek działania różnorodnych czynników stresowych, m.in. deficytu wody (Wang i in., 2004; Xu i in., 2011). Zarówno w warunkach fizjologicznych jak i stresowych przypisywana jest im funkcja białek utrzymujących stan homeostazy komórkowej. Pełnią one funkcje molekularnych czaperonów, które poprzez stabilizację struktur komórkowych, pozwalają na prawidłowe funkcjonowanie komórek. Ich opiekuńcze działanie związane jest z kontrolą procesu fałdowania białek, ich oligomeryzacji, translokacji przez błony, czy degradacji. Ponadto zapobiegają agregacji białek, modulują aktywność receptorów, pełnią funkcje obronne dla mRNA (Sule i in., 2004; Timperio i in., 2008; Al.-Whaibi, 2011). W zależności od masy molekularnej, sekwencji aminokwasowej, a zarazem pełnionych

funkcji, białka szoku cieplnego zostały pogrupowane w pięć rodzin: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 oraz sHSP (ang. *small HSP*) (Kotak i in., 2007; Gupta i in., 2010).

Rodzina białek HSP100 (ang. *Heat Shock Protein 100 kDa*), określana także jako kazeino-lityczne proteazy Clp (ang. *Caseino-lytic protease*), reprezentowana jest przez szeroką grupę ATP-zależnych białek, których funkcje związane są przede wszystkim z dezagregacją lub degradacją zagregowanych, niefunkcjonalnych peptydów. Ponadto wydaje się, że odgrywają one istotną rolę w przystosowaniu się organizmu do warunków istniejących po ustąpieniu działania stresu (Wang i in., 2004). Domena regulatorowa kompleksu kazeino-litycznej proteazy serynowej kodowana jest przez gen *ERDI* (ang. *Early Responsive to Dehydration*), którego ekspresja zachodzi w warunkach starzenia się komórek, a także we wczesnych etapach dehydratacji tkanek. W badaniach na rzodkiewniku wykazano, że nadekspresja genu *ERDI* indukowana jest deficytem wody, wysokim zasoleniem gleby oraz długotrwałą ekspozycją na światło (Nakashima i in., 1997). Protoplastowa kazeino-lityczna proteza serynowa zidentyfikowana została w niniejszej pracy u syryjskiej odmiany rodzicielskiej oraz w liniach populacji mapującej M_{Cam}, gdzie wykazywała podwyższony profil akumulacji w roślin poddawanych działaniu stresu. W przypadku odmian europejskich białko to nie wykazywało statystycznie istotnej zmiany w profilu ekspresji. Dla porównania, w badaniach prowadzonych na pszenicy wykryto zwiększony poziom akumulacji proteazy Clp u odmian tolerancyjnych na deficyt wody (Demirevska i in. 1998), natomiast w doświadczeniach prowadzonych na liściach jęczmienia wykazano podwyższoną akumulację białek HSP100 zarówno u wrażliwych jak i odpornych genotypów (Ashoub i in., 2013). W większości prac dotyczących liści, zmiany poziomu białek Clp związane są z wpływem suszy na zmiany w aktywności systemu fotosyntetyzującego, głównie aktywności enzymu RubisCo, jednakże sugeruje się, że ich obecność w korzeniach może świadczyć o potencjalnej roli w odpowiedzi na deficyt wody (Clark i in. 1999).

Podczas przeprowadzonych eksperymentów obserwowano w korzeniach indukowane suszą zmiany w poziomie akumulacji białek szoku cieplnego o masie 70 kDa (HSP70), których funkcje związane są z zapobieganiem agregacji nowo zsyntetyzowanych białek, kontrolą procesu ich fałdowania, oraz translokacją do docelowych struktur komórkowych. Ponadto białka te uczestniczą w kierowaniu nieprawidłowo sfaldowanych białek do lizosomów, gdzie poddawane są proteolitycznej degradacji (Hartl, 1996; Fink, 1999; Boston, 1996). Kierunek zmian względnej ilości różnych izoform tego białka dla badanych genotypów jęczmienia nie był jednoznaczny. W przypadku linii Cam/B1/CI

obserwowano spadek poziomu dwóch izoform tego białka, natomiast odmiany Maresi i Stratus wykazywały odpowiednio wzrost i spadek poziomu akumulacji tych dwóch izoform. W obrębie linii populacji mapującej zidentyfikowano pięć izoform HSP70, jednakże kierunek zmian ich akumulacji nie był jednakowy. Występujące w największej liczbie linii izoformy wykazujące zmiany stężenia charakteryzowały się ujemnym efektem suszy. Większość z nich cechowały istotne statystycznie zmiany wynikające z interakcji pomiędzy genotypem a suszą. W opublikowanych badaniach prowadzonych na liściach jęczmienia o różnych genotypach poddawanych suszy wykazano, że spadkiem poziomu tych białek charakteryzowały się genotypy wrażliwe, natomiast wzrostem genotypy odporne (Ashoub i in., 2013). Inne badania proteomiczne jęczmienia ujawniły podobne wyniki, co może wskazywać na istotne znaczenie białek HSP70 w odpowiedzi na deficyt wody (Kasuar i in., 2013). Eksperymenty przeprowadzone na tytoniu z nadekspresją genu kodującego HSP70 wykazały, że rośliny transgeniczne charakteryzowały się zwiększoną tolerancją na niedobór wody, związaną z utrzymaniem optymalnej zawartości wody komórkowej w porównaniu do roślin kontrolnych (Cho i in., 2005). Stres suszy spowodował także zmiany w poziomie akumulacji innych białek HSP70 w obrębie populacji mapującej – zidentyfikowano izoformę białka wiążącego światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego (BiP, ang. *Luminal Binding Protein*), które podobnie jak inne białka szoku cieplnego pełni funkcje w kontroli procesu fałdowania białek w obrębie tego organellum. W wyniku działania stresów abiotycznych, w tym suszy dochodzi do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania retikulum endoplazmatycznego, objawiającego się zwiększoną ilością nieufałdowanych lub nieprawidłowo ufałdowanych białek. W wyniku zaburzonej homeostazy tego organellum dochodzi do aktywowania kaskady odpowiedzi na nieufałdowane białka (UPR, ang. *Unfolded Protein Response*), pozwalającej na zachowanie równowagi pomiędzy możliwościami fałdowania białek a ich sekrecją. Następuje zahamowanie syntezy białek, co związane jest z zwiększoną akumulacją białek opiekuńczych, i ich zdolnością do przeprowadzenia procesu fałdowania. Uruchomienie kaskady reakcji UPR kontrolowane jest przez białka BiP, które pełnią funkcje sensorów nieprawidłowo ufałdowanych białek (Malhotra i in., 2007). Izoforma białka wiążącego światła retikulum endoplazmatyczne zidentyfikowana została u osobników rodzicielskich i w 70% badanych linii potomnych M₁Cam, u których charakteryzowała się wzrostem w poziomie akumulacji u roślin poddawanych działaniu suszy. Prowadzone równoległe badania na tym samym materiale roślinnym, jednakże na poziomie proteomu liścia, wykazały, że wzrost poziomu akumulacji dwóch izoform białka

BiP charakteryzował niemal wszystkie badane linie populacji M_{Cam}. Ponadto białka te wykazywały silną korelację wobec siebie i interakcję genotyp \times susza (Rodziewicz, 2014). Podobny kierunek zmian stężeń białka wiążącego światła ER w obrębie liścia i korzenia w dużej liczbie badanych osobników, pomimo dużego zróżnicowania względnej ilości w poszczególnych liniach, może korelować ze zbliżonym poziomem tolerancji na suszę określonych linii wsobnych i odmian rodzicielskich badanej populacji. Badania na soi i tytoniu z nadekspresją genu *soyBiP* wykazały, że w warunkach suszy transgeniczne rośliny charakteryzowały się mniejszym spadkiem względnej zawartości wody w liściach w porównaniu do roślin typu dzikiego. Ponadto w mniejszym stopniu następowało zamykanie aparatów szparkowych, co związane było z niewielkim stopniem ograniczenia transpiracji i spadkiem aktywności fotosyntetycznej. Jednakże rośliny te nie wykazywały podwyższonego poziomu akumulacji osmolitów, zwiększonej masy korzeni i nie charakteryzowały się wzrostem ekspresji kilku genów, które indukowane są deficytem wody w roślinach typu dzikiego (Valente i in., 2009). Rola białek wiążących światła retikulum endoplazmatycznego w tolerancji na stresy abiotyczne nie jest do końca poznana. Sugeruje się, że białka te przyczyniają się do utrzymania prawidłowej integralności retikulum endoplazmatycznego i zapewnienia środowiska do prawidłowego fałdowania białek. Ponadto uważa się, że poprzez kontrolę kaskady odpowiedzi UPR przyczyniają się, do kontrolowania poziomu akumulacji białek syntetyzowanych w warunkach działania stresu, m.in. białek obronnych (Alvim i in., 2001).

W odpowiedzi na zaistniały czynnik stresowy zmiany w profilu akumulacji wykazały też białka szoku cieplnego, których masy cząsteczkowe obejmują zakres od 12 do 40 kDa (sHSP). Wśród nich rozpoznawanych jest wiele klas białek, kodowanych przez sześć grup genów jądrowych, których ekspresja wyrażona jest w odpowiedzi na stres środowiskowy, taki jak susza, chłód, ciepło, czy zasolenie (Sun i in., 2002, Waters i in., 1996; Vierling, 1991). Ich funkcje obronne związane są ze zdolnością wiązania zdenaturowanych białek, stabilizacją ich struktury oraz zapobieganiem agregacji. Poprzez ATP-zależną zdolność oddziaływania z innymi białkami HSP umożliwiają kierowanie białek do ich ponownego procesu fałdowania (Lee i Vierling, 2000). Białka sHSP o masie cząsteczkowej 16.6 kDa, wyizolowane z grochu zwyczajnego, wykazywały zdolność wiązania zdenaturowanych białek, a następnie ich ponownego fałdowania, poprzez tworzenie kompleksu z HSP70 i HSP100 (Mogk i in., 2003). Inne badania wykazały, że ekspresja mitochondrialnych sHSP u kukurydzy związana była z poprawą wydajności mitochondrialnego transportu elektronów w stresie oksydacyjnym, poprzez ochronę

dehydrogenazy NADH (Hamilton i Heckathorn 2001). W przeprowadzonej pracy doktorskiej w genotypach rodzicielskich, referencyjnych i liniach populacji mapującej zidentyfikowano kilka izofrom białka szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 16.9 kDa, których względna zawartość u roślin poddawanych stresowi suszy uległa wzrostowi w stosunku do kontroli. Wyniki analizy celowanej wykazały, że odmiana Maresi charakteryzowała się ponad 10-krotnym wzrostem poziomu akumulacji, a linia CamB1/CI i odmiany referencyjne wykazywały 3-krotny wzrost, przy czym poziom białka u roślin kontrolnych był znacznie wyższy u odmiany syryjskiej. Wykorzystane metody oceny statystycznej w analizie niecelowanej pozwoliły na znalezienie sześciu izoform białka sHSP 16.9 kDa, spośród których dwie izoformy niemal we wszystkich liniach wykazywały wzrost poziomu akumulacji, silną korelację wobec siebie, bardzo wysoki dodatni poziom efektu suszy oraz silną interakcję genotyp \times susza, która związana była z dużymi różnicami w wielkości wzrostu poziomu tego białka. Względna zawartość białka u roślin poddawanych działaniu suszy wykazywała od 2 do 19-krotny wzrost w porównaniu do roślin kontrolnych. Ponadto u linii CamB1/CI i we wszystkich badanych liniach wsobnych zaobserwowano zmianę poziomu akumulacji białka szoku cieplnego o masie 17.6 kDa. Linia rodzicielska i większość linii potomnych wykazywały podwyższoną ekspresję tego białka w warunkach deficytu wody. Zmiany poziomu akumulacji małych białek szoku cieplnego obserwowano w wielu gatunkach roślin uprawnych, podczas odpowiedzi na różne stresy abiotyczne. I tak, w przypadku analizy zmian proteomu dwóch różnych odmian jęczmienia w warunkach stresu ciepła zidentyfikowano siedem izoform białka sHSP 16.9 kDa i trzy izoformy białka 17.6 kDa. Znaczący wzrost profilu ekspresji tych białek widoczny był u odmiany tolerancyjnej w porównaniu z odmianą wrażliwą na stres (Sule i in., 2004). Badania przeprowadzone na rzodkiewniku z konstytutywną nadekspresją genu *sHSP17.8* wykazały, że rośliny transgeniczne w stosunku do form dzikich posiadały zwiększoną tolerancję na stres ciepła, zasolenia, deficyt wody i stres osmotyczny. Rośliny porównywano względem kilku parametrów: szybkości wzrostu hipokotyli, testu aktywności SOD oraz pomiaru wycieku elektrolitów z liści. Zaobserwowano także, że w warunkach stresu osmotycznego transformowane rośliny wykazywały zwiększoną zawartość proliny i charakteryzowały się relatywnie zwiększoną długością korzeni (Jiang i in., 2009). Badania prowadzone na transgenicznym ryżu, z nadekspresją genu *sHSP17.7*, który poddawany był działaniu suszy, ujawniły, że rośliny transgeniczne nie wykazywały znaczących różnic w poziomie potencjału wody w komórkach w porównaniu do form dzikich. Jednakże stwierdzono, że transformowane rośliny charakteryzowały się szybszym

i większym wzrostem po ponownym nawodnieniu (Sato i in., 2008). Działanie stresu suszy w znaczący sposób wpływa na zmiany wielkości komórek, które skutkować mogą większym skupieniem składników cytoplazmatycznych, czy zwiększoną szansą na interakcję pomiędzy molekułami, co prowadzić może do denaturacji wielu białek, czy fuzji błon komórkowych. Ponieważ białkom szoku cieplnego o małych masach cząsteczkowych przypisywane się funkcje związane z asocjacją błon komórkowych uważa się, że w znaczący sposób mogą wpływać na prawidłowe utrzymanie architektury tych struktur, co związane jest z zachowaniem większej stabilności i integralności organelli roślin wzrastających w warunkach deficytu wody (Sato i in. 2008). Indukcja białek sHSP u soi, wywołana stresem ciepła korelowała pozytywnie z utrzymaniem prawidłowej struktury błony komórkowej, zmniejszeniem dezorganizacji struktur komórkowych oraz zwiększoną intensywnością stopnia agregacji do błon białek obronnych o masach 15 kDa (Lin i in., 1985). Ze względu na funkcje stabilizujące białek sHSP, a także ich obfitość występowania w komórkach roślinnych w warunkach różnych stresów abiotycznych uważa się, że mogą one stanowić ważny element nabytej odporności roślin na stresy środowiskowe (Waters i in., 1996; Sun i in., 2002; Wang i in., 2004).

Degradacja białek jest niezbędnym elementem dla utrzymania białkowej homeostazy i prawidłowego funkcjonowania komórki. Proteasom to wieloenzymatyczny kompleks, który w połączeniu z ubikwityną tworzy system ubikwityna-proteasom (UPS, ang. *Ubiquitin-Proteasome System*), pełniący ważną funkcję w procesie usuwania nieprawidłowo ufałdowanych, czy zagregowanych białek. Proces ubikwitynacji polega na przyłączeniu łańcuchów ubikwityny do degradowanego białka, a następnie jego kierowanie do proteasomu 26S, w którym ulega ono hydrolizie z uwolnieniem cząsteczki ubikwityny. System UPS stanowi niezwykle ważny element w adaptacji i odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe, takie jak zasolenie, susza, chłód, czy przy ograniczonym dostępie składników odżywczych. Wykazano, że w znaczący sposób wpływa na regulację transdukcji sygnałów indukowanych hormonami, m.in. kwasem abscysynowym. Uważa się, że poprzez modulowanie czynników transkrypcyjnych i innych białek regulatorowych, kompleks UPS może w znaczący sposób wpływać na regulację ekspresji wielu genów zaangażowanych w odpowiedź na zaistniały stres środowiskowy. Kluczowe znaczenie odgrywać może ligaza E3, która rozpoznaje białka kierowane do procesu degradacji (Stone, 2014). Badania prowadzone na rzodkiewniku wykazały, że czynniki transkrypcyjne DREB (ang. *DRE-Binding Factors*), regulujące ekspresję wielu genów odpowiadających na suszę i zasolenie, modulowane są przez kompleks UPS (Qin i in.,

2008). W przeprowadzonych analizach proteomicznych jęczmienia zidentyfikowano różne podjednostki kompleksu proteasomu 26S. Genotypy rodzicielskie charakteryzowały się zmianą poziomu akumulacji tych białek - odmiana Maresi wykazywała spadek w ich akumulacji, a linia hodowlana CamB1/CI wzrost, przy czym poziom białka w odniesieniu do roślin kontrolnych u odmiany syryjskiej był o wiele wyższy niż u odmiany niemieckiej. W obrębie linii populacji mapującej znaleziono sześć izoform podjednostek proteasomu 26S, które wykazały statystycznie istotny efekt suszy. Jednakże jedną z nich charakteryzował wysoki dodatni efekt suszy w 30% linii, a inna izoforma wykazała wysoki ujemny efekt suszy w 15% innych linii. Dla porównania, badania proteomiczne przeprowadzone na kontrastujących genotypach ryżu, który poddany został działaniu stresu osmotycznego, wykazały, że podwyższony poziom akumulacji dwóch podjednostek proteasomu 26S charakteryzował genotyp odporny. Ponadto poziom akumulacji tych białek w roślinach kontrolnych o genotypie odpornym był wyższy niż w roślinach stresowanych genotypu wrażliwego (Zang i Komatsu, 2007).

Analizując odpowiedź jęczmienia na poziomie białek zaangażowanych w utrzymanie stanu homeostazy komórkowej, związanej z procesem kontroli fałdowania, degradacji białek, czy też zapewnienia integralności błon komórkowych można zauważyć, że odmiany rodzicielskie wykazywały podobny kierunek reakcji, z różnicami w wielkości intensywności tej zmiany. Biorąc pod uwagę ilościowe różnice w profilach określonych białek zauważono, że odmiana Maresi wykazywała tendencje do silniejszego wzrostu w warunkach deficytu wody, jednak patrząc na profile proteomów w warunkach kontrolnych dostrzec można, że linia syryjska wykazuje zdolności do akumulowania tych samych białek w wyższych stężeniach.

W obrębie badanych odmian zidentyfikowano białka kodowane przez geny z rodziny *Cor* (ang. *Cold regulated genes*). W promotorach genów *Cor* zlokalizowane są elementy regulatorowe określane jako CRT/DRE (ang. *C-Repeat/Dehydration Responsive Element*), wiązane przez czynniki transkrypcyjne typu DREB, które indukowane są w warunkach suszy, stresu wodnego i niskich temperatur. Produktami większości genów *Cor* są hydrofilowe, niewykazujące aktywności enzymatycznej białka, wśród których bardzo liczną grupę stanowią białka późnej embriogenezy (LEA, ang. *Late Embryogenesis Abundant Proteins*). Stanowią one rodzinę molekuł, które u roślin wyższych akumulowane są w wysokich stężeniach w tkankach zarodkowych podczas ostatnich faz dojrzewania nasion (Baker i in., 1989). Ich obecność zauważono także w wegetatywnych częściach roślin, gdzie akumulowane są w dużych ilościach na skutek

dehydratacji tkanek, będącej efektem suszy, zasolenia gleby, czy ekstremalnych temperatur (Bray, 1993, 1997; Hundertmark i Hinch, 2008). Dehydryny stanowią dobrze scharakteryzowaną, odrębną biochemicznie grupę białek LEA, która określana jest jako grupa 2 LEA (Dure i in., 1989). Chociaż funkcje białek LEA nie są do końca poznane, wydaje się, że dehydryny odgrywają kluczową rolę ochronną w warunkach odwodnienia komórek (Hanin i in., 2011). Mechanizm ich działania związany jest z ochroną tkanek przed dehydratacją poprzez tworzenie środowiska korzystnego dla działania innych molekuł ochronnych, co związane jest stabilizacją struktur komórkowych, czy ochroną antyoksydacyjną (Goyal i in., 2005; Kovacs i in., 2008). Dzięki własnej ultrastrukturze i hydrofilowym charakterze wykazują odporność na agregację i same pełnią funkcję antyagregacyjną dla innych białek. Badania wskazują, że białka LEA wykazują zdolność stabilizacji i integracji błon komórkowych, poprzez wiązanie fosfolipidów, dzięki czemu utrzymana zostaje struktura dwu-warstwy lipidowej (Koag i in., 2003, 2009). Inną przypisywaną im funkcją jest zdolność pochłaniania kationów powstających na skutek stresu oksydacyjnego komórek, które mogą przyczynić się do generowania reaktywnych form tlenu (Kovacs i in. 2008, Tunnacliffe i in., 2010). Badania na transgenicznym tytoniu z nadekspresją dehydryny CuCOR19 wykazały, że w warunkach stresu chłodu uzyskane rośliny charakteryzowały się obniżonym poziomem rodników hydroksylowych, co świadczy o antyoksydacyjnym działaniu tych białek (Hara i in., 2005). Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy proteomiczne jęczmienia wykazały zmiany poziomu ekspresji białek kodowanych przez geny *Cor* w obrębie genotypów rodzicielskich i 40% linii potomnych populacji M_{Cam}. Kierunek zmian we wszystkich przypadkach był dodatni, a linie potomne charakteryzowały się wysokim dodatnim efektem suszy. W celu poznania funkcji pełnionych przez rodzinę białek LEA w stresie suszy, prowadzone były badania na wielu gatunkach roślin. Przykład mogą stanowić doświadczenia wykonane na trzech kontrastujących genotypach pszenicy poddanej działaniu suszy. Autorzy pracy zidentyfikowali dehydrynę COR410, która wykazywała podwyższony profil ekspresji we wszystkich badanych genotypach, jednakże najwyższy poziom wzrostu odnotowany został w przypadku genotypu wrażliwego na deficyt wody (Ford i in., 2011). W innych badaniach dotyczących pszenicy poddanej działaniu suszy, w trzech z siedmiu badanych odmian wykryto dehydrynę o masie cząsteczkowej 24 kDa, której obecność skorelowano m.in. z większym wzrostem pędów, charakteryzującym te genotypy (Lopez i in., 2003). W przypadku transgenicznej pszenicy, z nadekspresją genu *HVA1*, kodującego jedno z białek

LEA, zaobserwowano zwiększoną odporność na desykcję protoplastu, co skorelowane było także zwiększoną biomasą rośliny (Sivamani i in., 2000).

W obrębie badanych genotypów zidentyfikowano także białka określane jako uniwersalne białka stresu (USP, ang. *Universal Stress Proteins*) - małe, cytoplazmatyczne molekuly, których ekspresja indukowana jest w warunkach stresu wodnego, solnego, wysokich temperatur i obecności metali ciężkich. Rola tych białek w komórkach roślinnych nie jest dobrze poznana, jednak ze względu na obecność konserwatywnych domen porównywalnych do bakteryjnych, przypuszcza się, że wiążą nukleotydy i uczestniczą w regulacji transdukcji sygnałów komórkowych (Isokpehi i in., 2011). U bawełny zidentyfikowano geny *GUSP1* i *GUPS2* kodujące białka z rodziny USP, których funkcje najprawdopodobniej związane są z ochroną komórek przed dehydratacją w warunkach deficytu wody (Maqbol i in., 2009). W pracach prowadzonych na jęczmieniu zidentyfikowano 16 genów kodujących białka z rodziny USP, z których 8 uległo ekspresji pod wpływem działania stresu solnego. Produkty tych genów – uniwersalne białka stresu akumulowane były zarówno w liściach jak i korzeniach jęczmienia, jednakże znacznie większy poziom akumulacji obserwowany był w genotypie wrażliwym na stres solny niż w genotypie tolerancyjnym (Li i in., 2010). W przypadku analiz przeprowadzonym w niniejszej pracy zaobserwowano wzrost poziomu akumulacji białka należącego do rodziny USP w niemieckiej odmianie rodzicielskiej. Trzy izoformy tego białka, charakteryzujące się dodatnim efektem suszy zidentyfikowano w 10% linii populacji mapującej. U syryjskiej odmiany rodzicielskiej nie zaobserwowano zmian w profilu akumulacji tego białka. Uważa się, że w trakcie działania stresu osmotycznego, związanego zarówno z suszą jak i wysokim zasoleniem dochodzi do zużywania dużych ilości energii. Ze względu na to, że białka USP wykazują aktywność ATP-azową, sugeruje się, że ich zwiększona ekspresja w genotypie wrażliwym związana może być z większym zapotrzebowaniem komórek na ATP (Li i in., 2010).

Reaktywne formy tlenu powstają w komórkach roślinnych podczas naturalnych, biochemicznych procesów metabolicznych, jako skutek kolejnych stopni redukcji cząsteczki tlenu (Gill i Tuteja, 2010a). Są to produkty uboczne procesów zachodzących w organellach charakteryzujących się wysoką aktywnością metaboliczną, takich jak chloroplasty, mitochondria, czy peroksysomy (Rasmusson i in., 2004; del Rio i in., 2002). W naturalnych stężeniach reaktywne formy tlenu uczestniczą w regulacji ścieżek sygnałowych, w aktywacji procesów obronnych, a także w aklimatyzacji do zmieniających się warunków środowiskowych (Dat i in., 2000). Na skutek działania stresu

środowiskowego, jakim jest min. susza, dochodzi do generowania ich nadmiernych ilości, które stają się dla komórki toksyczne. Ograniczony dostęp dwutlenku węgla, będący następstwem mechanizmu zamykania aparatów szparkowych, skutkuje przeniesieniem elektronów na tlen, który staje się źródłem wolnych rodników. Powstający stres oksydacyjny przyczynia się do zaburzenia homeostazy komórkowej, poprzez zdolność utleniania białek, lipidów, czy kwasów nukleinowych, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki (Dat 2000; Polle 2001). W celu zachowania balansu pomiędzy ilością powstających, a usuwanych reaktywnych form tlenu (ROS ang. *Reactive Oxygen Species*) rośliny rozwinęły enzymatyczne i nie enzymatyczne mechanizmy obronne, często uczestniczące w tych samych szlakach metabolicznych (Farooq, 2009).

Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *Superoxide Dismutase*) jest enzymem występującym we wszystkich przedziałach komórkowych, gdzie generowane są reaktywne formy tlenu. Stanowi pierwszą linię obrony przed toksycznymi cząsteczkami, katalizując reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) do tlenu i nadtlenu wodoru. Szacuje się, że katalizowana reakcja jest 100-krotnie szybsza, aniżeli spontaniczna reakcja dysmutacji (Mittler, 2002). Zmiany poziomu akumulacji tego białka obserwowane były u odmiany rodzicielskiej Maresi i odmian referencyjnych, które charakteryzowały się ponad dwukrotnie obniżonym stężeniem SOD w korzeniach roślin wzrastających w warunkach suszy. Podczas przeprowadzonych eksperymentów ekspresja SOD u syryjskiej linii rodzicielskiej nie uległa istotnej statystycznie zmianie w odpowiedzi na zaistniały stres. Natomiast w przypadku linii potomnych M_{Cam} zidentyfikowano trzy izoformy tego enzymu, przy czym dwie z nich wykazywały istotny statystycznie efekt suszy i interakcję genotyp \times susza. W przypadku mitochondrialnej formy tego białka, występującej u wszystkich linii wsobnych, zaobserwowano dodatni efekt suszy. Odwrotnie, dla formy zlokalizowanej w peroksysomach, obecnej w 75% linii, wykazano wysoki ujemny efekt suszy. Przypuszcza się, że zwiększona akumulacja enzymu w obrębie mitochondriów, może świadczyć o sprawniejszym mechanizmie usuwania O_2^- , który ze względu na funkcje pełnione przez to organelum generowany jest w znacznie większych ilościach. Do wzmożonej syntezy O_2^- w obrębie mitochondriów dochodzi na skutek wycieku elektronów z łańcucha oddechowego, czego częstą przyczyną jest stres termiczny, a nadmierna produkcja zachodzi w tkankach nefotosyntetyzujących. W peroksysomach zlokalizowanych w korzeniach, ilości powstających O_2^- są znacznie mniejsze (Rhoads i in., 2006), co może tłumaczyć obniżony poziom akumulacji odpowiedniej izofromy SOD w badanych liniach jęczmienia. Co ciekawe, wyniki licznych badań wskazują na istotną rolę

dusmutazy ponadtlencowej w nabywaniu przez rośliny tolerancji na suszę. Zwiększonym poziomem cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlencowej charakteryzowały się liście siewek pszenicy zarówno odpornych jak i wrażliwych na deficyt wody, jednakże dla odmian tolerancyjnych wzrost był bardziej wyraźny (Ford i in., 2011). W innych badaniach przeprowadzonych na liściach tolerancyjnej i odpornej na suszę odmiany pszenicy wykazano, że podwyższony poziom akumulacji manganianowej dysmutazy ponadtlencowej charakteryzował oba genotypy, jednak znacznie wyższą akumulację zaobserwowano u odmiany wrażliwej, zwłaszcza w fazie kwitnienia i napełniania ziarna (Simova-Stoilowa i in., 2009). W przypadku nadekspresji genu kodującego MnSOD u topoli, rośliny wykazywały wyższą aktywność enzymu, która związana była między innymi z 8-23 krotnie wyższą masą nasion, uzyskiwanych w warunkach stresu oksydacyjnego (Wang i in., 2010). Zwiększona ekspresja genu *MnSOD* u pszenicy poddawanej działaniu stresu oksydacyjnego związana była z obniżonym stopniem uszkodzeń oksydacyjnych, m.in. niższą peroksydacją lipidów w stosunku do roślin typu dzikiego (Melchiorre i in., 2009). W innych badaniach z nadekspresją genu *MnSOD* wykazano, że transgeniczny rzodkiewnik wykazywał odporność na wysokie zasolenie gleby (Wang i in., 2004), a ryż z nadekspresją genu *Cu/ZnSOD* był tolerancyjny na stres oksydacyjny, zasolenie i suszę (Prashanth i in., 2008).

Cykl askorbinianowo-glutationowy (APX-GSH, ang. *Ascorbate-Glutathione Cycle*), zwany też cyklem Halliwella-Asady, stanowi mechanizm usuwania nadtlenu wodoru z wykorzystaniem kwasu askorbinowego i glutationu (Jimenez, 1997; Fazeli i in., 2007). Kluczowym enzymem cyklu jest peroksydaza askorbinianowa (APX, ang. *Ascorbate Peroxidase*), która wykorzystując cząsteczkę askorbinianu redukuje H_2O_2 do wody, z jednoczesnym generowaniem monodehydroaskorbinianu, redukowanego do dehydraskorbinianu, a reakcje te katalizowane są przez dwa enzymy: reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDAR ang. *Monodehydroascorbate Reductase*) i reduktazę dehydroaskorbinianową (DHAR ang. *Dehydroascorbate Reductase*). Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza proteomiczna ujawniła, że w liniach rodzicielskich i odmianie Stratus cytoplazmatyczna peroksydaza askorbinianowa charakteryzowała się spadkiem poziomu akumulacji w warunkach deficytu wody, przy czym odmiany europejskie wykazywały silniejsze spadki w porównaniu do linii syryjskiej. W liniach populacji mapującej MCam zidentyfikowano dziesięć izoform tego enzymu, z których sześć – zlokalizowanych w cytoplazmie i peroksysomach wykazywało istotny statystycznie ujemny efekt suszy. Pozostałe enzymy szklaku: MDAR i DHAR w obrębie linii wsobnych także

wykazywały ujemny efekt suszy. W badaniach proteomu liścia uzyskanego z tego samego materiału roślinnego wykazano indukowany suszą spadek akumulacji chloroplastowej peroksydazy askorbinianowej u osobników rodzicielskich i w większości linii potomnych MCam (Rodziewicz, 2014). Dane literaturowe dotyczące zmian poziomu ekspresji genów i ilości transkryptów *APX* w różnych tkankach (liściach, pędach i korzeniach) kontrastujących genotypów ziemniaka wskazują, że odmiany wrażliwe na wysokie stężenia soli charakteryzowały się mniejszą ilością transkryptów peroksydazy askorbinianowej zlokalizowanej w chloroplastach i cytoplazmie w porównaniu do odmiany odpornej (Lin i Pu, 2000). Analizy proteomu liści odmian ciecierzycy, wykazujących różny stopień odporności na dehydratację, wykazały, że tylko genotypy odporne charakteryzowały się zwiększoną akumulacją peroksydazy askorbinianowej (Subba i in., 2013).

S-transferazy glutationowe (GST, ang. *Glutathione S-transferase*) są obficie występującymi białkami, które biorą udział w detoksykacji produktów ubocznych stresu oksydacyjnego, a ich aktywność w komórkach regulowana jest przez H_2O_2 . Katalizują reakcję sprzęgania glutationu ze związkami elektrofilowymi, w tym ksenobiotykami. Roślinnym GST przypisywane są funkcje detoksykacji herbicydów i nadtlenu wodoru, ale także regulacja homeostazy hormonalnej, apoptozy i odpowiedzi komórki na stres środowiskowy (Dixon i in., 2011). Podczas przeprowadzonych eksperymentów różnice w akumulacji GST obserwowane były w korzeniach linii rodzicielskiej CamB1/CI, natomiast odmiana Maresi nie wykazywała istotnej zmiany względnej ilości tego białka podczas odpowiedzi na deficyt wody. W obrębie linii potomnych zidentyfikowano cztery izoformy tego enzymu, które charakteryzowały się wysokim dodatnim efektem suszy, a dwie z nich dodatkowo wykazywały interakcje genotyp \times susza. Podobne wyniki uzyskano w analizie zmian proteomu liści kontrastujących odmian jęczmienia poddawanego działaniu wysokich stężeń soli – znacznie wyższy poziom akumulacji GST obserwowano dla genotypu tolerancyjnego na stres solny w porównaniu do genotypu wrażliwego (Witzel i in., 2009). Nadekspresja genu kodującego *S*-transferazę glutationu u tytoniu wpłynęła na zwiększoną akumulację glutationu i kwasu askorbinowego, a także enzymów szlaku APX-GSH, co skutkowało szybkim usuwaniem H_2O_2 i niewielkim poziomem uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym w porównaniu do roślin typu dzikiego (Roxas i in., 1997, 2000). W przypadku transgenicznego ryżu z nadekspresją genu *OsGSTU4* wykazano mniejszą wrażliwość na hormony, m.in. na kwas abscysynowy, zwiększoną aktywność

antyoksydacyjną, oraz podwyższoną ekspresję kilku genów odpowiadających na stres oksydacyjny i wysokie zasolenie w porównaniu do roślin kontrolnych (Sharma i in., 2014).

Peroksyredoksyny stanowią dużą rodzinę białek, którym przypisywane są funkcje związane z neutralizowaniem H_2O_2 , nadtlenków wodorowych i reaktywnych form azotu. Ponadto uważa się, że uczestniczą w regulacji ścieżek sygnalnych regulowanych przez rodniki wodorowe i azotowe. Sugeruje się, że peroksyredoksyny zlokalizowane w obrębie mitochondriów związane są z regulacją wzrostu korzeni w warunkach stresów abiotycznych (Dietz i in., 2006). Dla dwóch izoform peroksyredoksyn obserwowano wzrost poziomu akumulacji w warunkach stresu u linii hodowlanej CamB1/CI. Próbkę z drugiej formy rodzicielskiej – Maresi, nie wykazywały podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym obecności plamki reprezentującej to białko. U linii potomnych znaleziono dwie izoformy tego enzymu, które wykazywały dodatni efekt suszy i interakcję pomiędzy genotypem a suszą. Zwiększony poziom akumulacji peroksyredoksyny obserwowano między innymi u buraka cukrowego poddawanego działaniu suszy (Hajheidari i in., 2005), jak również w liściach i korzeniach tolerancyjnych odmian sorgo (Sharma i in., 2003).

Liaza laktoglutationowa, zwana także glioksylazą I, jest enzymem biorącym udział w detoksykacji metyloglioksalu, związku będącego produktem ubocznym metabolizmu węgla i azotu. Szacuje się, że w warunkach stresu suszy, czy wysokiego zasolenia dochodzi do ponad 6-krotnego wzrostu metyloglioksalu, który poprzez toksyczne oddziaływanie prowadzi do zahamowania proliferacji komórek, czy nieprawidłowych oddziaływań pomiędzy białkami i kwasami nukleinowymi, co w dużej mierze prowadzi do procesu mutagenyzy. W komórkach poddawanych działaniu stresu oksydacyjnego dochodzi do zwiększonej aktywności liazy laktoglutationowej, która katalizuje przekształcenie metyloglioksalu do *S*-laktoiloglutationu, który następnie hydrolizowany jest do *D*-mleczanu, przez glioksylazę II (Yadav i in., 2005). Liazę laktoglutationową zidentyfikowano w genotypach rodzicielskich jęczmienia, a także w odmianie referencyjnej Sebastian. We wszystkich przypadkach następował wzrost akumulacji tego białka w warunkach deficytu wody, jednakże zauważono, że linia CamB1/CI na poziomie kontroli wykazywała względnie większą ilość białka w porównaniu do odmian europejskich. W liniach populacji mapującej znaleziono trzy izoformy glioksylazy I, wykazujące istotny statystycznie dodatni efekt suszy. Zwiększony poziom transkrypty i akumulacji tego enzymu obserwowano także w korzeniach ryżu, który poddany został działaniu stresu chłodu (Lee i in., 2009). Zwiększonym poziomem glioksylazy I

charakteryzowały się też odporne na stres osmotyczny odmiany ryżu, natomiast odmiany wrażliwe nie wykazywały zmiany w poziomie akumulacji tego białka (Zang i Komatsu, 2007). W przypadku korzeni jęczmienia poddawanych działaniu wysokiego zasolenia, zaobserwowano wzrost względnej ilości białka zarówno u odmiany wrażliwej jak i odpornej w porównaniu do kontroli, jednakże wzrost akumulacji u odmiany odpornej był kilkukrotnie wyższy aniżeli u wrażliwej (Witzel i in., 2009). Transgeniczny tytoń, charakteryzujący się zwiększoną ekspresją genu kodującego liazę laktoglutationową wykazywał zwiększoną odporność na stres oksydacyjny (Singla-Perek i in., 2003), jednakże dopiero nadekspresja obydwóch enzymów odpowiedzialnych za rozkład metyloglioksalu w znaczący sposób wzmocniła ten efekt (Yadav i in., 2005).

W mechanizmach usuwania wolnych rodników uczestniczą także białka należące do rodziny germin. Germiny i białka germino-podobne stanowią dużą grupę białek, które w warunkach homeostazy akumulowane są w ziarniakach podczas fazy kiełkowania większości zbóż. Ze względu na wysoką termostabilność, odporność na działanie proteaz oraz aktywność oksydazy szczawianowej, germiny i białka germino-podobne zaangażowane są w reakcje obronne roślin (Lane, 2000). Aktywność oksydazy szczawianowej sprawia, że germiny posiadają zdolność rozkładania nadmiernych ilości nadtlenu wodoru powstającego w warunkach stresu osmotycznego (Patnaik i in., 2001). Dla blisko połowy badanych w tej pracy genotypów, w tym w niemieckiej odmianie rodzicielskiej i referencyjnych Sebastian i Stratus zidentyfikowano kilka izoform białka należącego do rodziny germin. W większości przypadków białko to charakteryzowało się ujemnym efektem suszy, w przypadku jednej z izoform widoczna była silna interakcja susza \times genotyp. Podobne wyniki uzyskano w analizie proteomicznej jednej z odmian ryżu wzrastającego w warunkach niedoboru wody, która określana była jako odmiana wrażliwa na zaistniały stres środowiskowy (Ke i in., 2001). Analiza transkryptomu jęczmienia wzrastającego w warunkach wysokiego zasolenia gleby ujawniła, że poziom transkryptów germin zmieniała się w zależności od długości trwania stresu. W początkowych fazach stresu poziom mRNA w odniesieniu do roślin kontrolnych i stresowanych nie uległ zmianie, natomiast dalsze utrzymywanie wysokiego stężenia soli wpłynęło na wzrost poziomu mRNA germin (Hurkman i Tanaka, 1996).

Zdolność roślin do utrzymania prawidłowych proporcji pomiędzy ilością akumulowanych reaktywnych form tlenu a aktywnością sprawnie działającego systemu antyoksydacyjnego ma kluczowe znaczenie dla przebiegu wielu procesów fizjologicznych. Ponieważ w wyniku obecności nadmiernych ilości ROS dochodzi do zaburzenia homeostazy

komórkowej, konieczne jest aktywowanie wielu genów, których ekspresja prowadzi do wzmożonej aktywacji enzymatycznych i nieenzymatycznych składników systemów usuwania wolnych rodników. Ich synteza, czy tempo powstawania mogą być ważnymi czynnikami determinującymi stopień odporności roślin na określony czynnik abiotyczny, w tym suszę (Ashraf, 2010; Ford i in., 2011; Gill i in., 2010).

W odpowiedzi na stres suszy w komórkach roślinnych dochodzi do akumulowania niskocząsteczkowych, nietoksycznych, rozpuszczalnych związków kompatybilnych, określanych mianem osmoprotektantów (Chen i Murata, 2002). Ich funkcje związane są z kompleksową ochroną komórek poprzez regulację osmotyczną, utrzymanie integralności błon komórkowych, stabilizację enzymów, czy detoksykację reaktywnych form tlenu (Bohnert i Jensen, 1996; Giri, 2011). Jednym z osmolitów syntetyzowanych w warunkach dehydratacji komórek jest betaina glicynowa (GB, ang. *Glycine Betaine*), czwartorzędowy związek amoniowy, wyizolowany po raz pierwszy z buraka cukrowego (Genard i in., 1991; Giri, 2011). U roślin wyższych syntetyzowana jest ona z choliny, która przekształcana jest do aldehydu betainowego, a kluczowym enzymem katalizującym reakcję utlenienia aldehydu betainowego do betainy glicynowej jest dehydrogenaza aldehydu betainowego (BADH, ang. *Betaine Aldehyde Dehydrogenase*). Podczas przeprowadzonych doświadczeń wzrost w poziomie akumulacji tego enzymu obserwowano u genotypów rodzicielskich i linii potomnych, jednakże względny wzrost ilości białka u odmiany Maresi dwukrotnie przewyższał wzrost u linii CamB1/CI. W przypadku korzeni połowy linii potomnych znaleziono trzy izoformy tego białka, które wykazywały statystycznie istotny dodatni efekt suszy. Wzrost poziomu akumulacji tego enzymu może świadczyć o wzmożonej syntezie osmolitu, której podwyższone ilości pojawiają się na skutek stresów wywołujących dehydratację komórek. Natomiast dwukrotnie wyższy poziom wzrostu enzymu w korzeniach odmiany niemieckiej, może sugerować o większych potrzebach uruchomienia kaskady reakcji prowadzących do syntezy osmoprotektantów, co wskazywałoby na mniejsze przystosowanie tej odmiany do deficytu wody. Opublikowane wyniki badań wskazują, że w warunkach stresowych dochodzi do wzmożonej aktywności genów kodujących dehydrogenazę aldehydu betainowego, syntezy białka, a tym samym do akumulowania wysokich stężeń metabolitu u wielu gatunków roślin, min., u trzciny cukrowej, jęczmienia, pszenicy, sorgo, czy szpinaku (Rhodes i Hansen, 1993; Yang, 2003; Chen i Murata, 2011). Doświadczenia przeprowadzone na liściach jęczmienia wykazały, że podwyższony poziom akumulacji BADH cechował wrażliwe odmiany, które wzrastały w warunkach deficytu wody (Ashoub

i in., 2013). W przypadku roślin transgenicznych, podwyższony poziom ekspresji genów kodujących enzymy szklaku biosyntezy betainy glicynowej przyczynia się do zwiększenia tolerancji tych roślin do zaistniałych warunków środowiskowych. Przykład może stanowić tytoń, u którego nadekspresja genu *BADH* związana była ze zwiększoną tolerancją stresu osmotycznego, będącego efektem wysokiego zasolenia gleby (Yang i in., 2008). Badania na transgenicznej pszenicy, z nadekspresją genu kodującego *BADH*, wykazały zwiększoną tolerancję na stres suszy i ciepła, która korelowała ze wzmożoną aktywnością fotosyntetyczną i antyoksydacyjną w porównaniu do roślin kontrolnych (Wang i in., 2010).

Drugim ważnym osmoprotektantem, syntetyzowanym w odpowiedzi na deficyt wody jest prolina. W warunkach działania stresu, aminokwas ten akumulowany jest nawet w stężeniu 100-krotnie wyższym w stosunku do warunków fizjologicznych. Funkcje obronne prolina związane są z jej działaniem jako zmiatacza wolnych rodników, czaperonu stabilizującego struktury komórkowe, czy regulatora potencjału osmotycznego (Verbruggen i Hermans, 2008; Szabados i Savoure, 2010). Prekursorem do syntezy prolina jest kwas glutaminowy, a kluczowym enzymem zaangażowanym w ten proces jest syntetaza delta-1-pirolidyno-5-karboksylanu (*P5CS*, ang. *Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase*) (Hu i in., 1992; Delauney i Verma, 1993). U wielu roślin enzym ten kodowany jest przez dwa geny, a ich aktywność regulowana jest poprzez sprzężenie zwrotne, związane z zawartością prolina obecnej w tkankach, takich jak na przykład korzenie. Regulacja transkrypcji genów zależna jest także od ścieżki sygnałnej, regulowanej przez kwas abscysynowy (Verbruggen, 2008). W przeprowadzonej w ramach tej pracy analizie proteomicznej jęczmienia wykazano, że zwiększonym poziomem akumulacji enzymu *P5CS* charakteryzowała się odmiana Maresi. Dla drugiego genotypu rodzicielskiego nie stwierdzono istotnych zmian w profilu akumulacji tego białka. W obrębie populacji mapującej M_{Cam} syntetaza delta-1-pirolidyno-5-karboksylanu wykazywała istotny statystycznie dodatni efekt suszy dla 40% linii potomnych. Badania przeprowadzone na wielu gatunkach roślin wskazują, że podwyższony poziom akumulacji prolina, przyczynia się do ich zwiększonej adaptacji do istniejących warunków środowiskowych. Przykład może stanowić transgeniczny tytoń z nadekspresją genu *P5CS*, który wykazał 18-krotnie wzmożoną syntezę prolina w stosunku do roślin kontrolnych. Rośliny charakteryzowały się zwiększonym potencjałem osmotycznym liści oraz wzrostem biomasy korzeni, co może wskazywać na wyższą odporność na stres osmotyczny, wywołany deficytem wody (Kishor i in., 1995). Jednakże uważa się, że zbyt wysoka zawartość prolina jest toksyczna i może prowadzić do śmierci komórkowej. Aktywowane są wówczas procesy kataboliczne

proliny, a jednym z enzymów katalizujących ten proces jest dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu (P5CDH *ang. Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase*) (Hellmann i in., 2000). W analizie proteomicznej przeprowadzonej dla korzeni odmian rodzicielskich i referencyjnych zaobserwowano zmiany poziomu akumulacji tego enzymu u linii hodowlanej CamB1/CI. Odmiana niemiecka i referencyjne nie wykazywały istotnych zmian w profilu akumulacji tego białka. Także w przypadku linii potomnych poziom akumulacji P5CDH nie uległ statystycznie istotnym zmianom. Obserwowane różnice w poziomie akumulacji syntetazy delta-1-pirolino-5-karboksylanu i podwyższony poziom enzymu katabolizującego prolinę w warunkach suszy, może wskazywać na bardzo wysoki poziom tego metabolitu w komórkach odmiany syryjskiej, co może korelować ze zwiększoną tolerancją tej linii na deficyt wody. Byłoby to również zgodne z relatywnie wyższym, w porównaniu do innych genotypów, poziomem akumulacji syntetazy delta-1-pirolino-5-karboksylanu obserwowanym w roślinach kontrolnych CamB1/CI. Duża różnica pomiędzy poziomem akumulacji P5CS w roślinach kontrolnych i poddawanych działaniu stresu obserwowana w przypadku odmiany niemieckiej, może wskazywać na większą wrażliwość tego genotypu na niedobór wody i wzmożoną ekspresję białek i metabolitów obronnych, m.in. BADH i proliny. W opublikowanej przez Hanson i współpracowników (1997) pracy eksperymentalnej podjęto próbę korelacji akumulacji proliny z poziomem tolerancji na suszę dla dwóch kontrastujących genotypów jęczmienia. Jednakże zależność pomiędzy wynikami uzyskanymi dla poziomu akumulacji tego metabolitu i wielkości uzyskiwanych plonów nie była wystarczająco jednoznaczna, żeby uznać prolinę za potencjalny biomarker mogący determinować odpowiedź badanych roślin na stres suszy (Hanson i in., 1997). Inne badania przeprowadzone na pszenicy wykazały, że względny poziom stężenia tego aminokwasu był porównywalny u odmian o różnym stopniu tolerancji na deficyt wody, jednakże odmiany określane jako tolerancyjne charakteryzowały się większym tempem akumulowania i metabolizowania proliny. Dlatego kluczowym dla mechanizmów tolerancji roślin na stres wydaje się być nie sam poziom wzrostu metabolitu, ale jego właściwa regulacja (Nayyar i in., 2003).

5.2. Białka zaangażowane w metabolizm węgla

Susza w znaczący sposób wpłynęła na zmianę profilu akumulacji białek związanych z metabolicznymi przemianami węgla. Do białek tych należą głównie enzymy biorące udział w procesie glikolizy, glukoneogenzy i cyklu kwasów trikarboksylowych. W obrębie genotypów rodzicielskich białka wykazujące zmiany profilu akumulacji w odpowiedzi na stres suszy stanowiły 28%, a w obrębie linii potomnych 22% z wszystkich białek różnicujących. W przypadku obydwóch podejść – analizy celowanej i niecelowanej dominowały białka wykazujące podwyższony poziom akumulacji. W obrębie linii populacji mapującej 33 białka wykazywały istotny statystycznie efekt suszy, a 18 białek wykazywało statystycznie istotne różnice będące efektem różnic genotypowych i wpływu niedoboru wody. Analiza PCO przeprowadzona dla tej kategorii funkcyjnej także wykazała istotne zróżnicowanie białek wykazujących zmiany profilu akumulacji w warunkach deficytu wody, od tych w warunkach kontrolnych.

Fruktokinaza jest enzymem katalizującym przekształcenie fruktozy do fruktozo-6-fosforanu – związku stanowiącego substrat wykorzystywany w wielu procesach metabolicznych, takich jak glikoliza, szlak pentozofosforanowy, czy w syntezie skrobi. Cukry odgrywają ważną rolę w regulowaniu poziomu wolnych rodników w komórkach roślinnych, co jest szczególnie ważne w warunkach działania stresów. Z jednej strony mogą uczestniczyć w szlakach metabolicznych generujących reaktywne formy tlenu, a także być zaangażowane w szlaki produkujące NADPH i w ten sposób neutralizować ROS. Sugeruje się, że fruktozo-6-fosforan charakteryzuje się większą zdolnością zmiatania wolnych rodników, aniżeli glukoza, czy fruktoza, dlatego fruktokinaza może pełnić ważną rolę w syntezie osmotitów i/lub ochronie antyoksydacyjnej roślin w warunkach stresu suszy (Fulda i in., 2011). Jednakże, ze względu na to, że zarówno wysoki jak i niski poziom cukru może jednocześnie wzmacniać syntezę wolnych rodników w jednych szlakach, a neutralizować w innych, związek pomiędzy cukrami a reaktywnymi formami tlenu nie jest do końca jasny. Ponadto cukry pełnią rolę cząsteczek sygnałowych, które w znaczący sposób mogą wpływać na regulację ekspresji wielu genów aktywowanych w warunkach stresowych (Couee i in., 2006; Zorb i in., 2010). W odpowiedzi na deficyt wody w jęczmieniu zidentyfikowano kilka izoform fruktokinazy. Podczas rozdziału białek wyizolowanych z korzeni odmian rodzicielskich poddanych stresowi suszy plamki reprezentujące izoformy tego enzymu wykazywały względny spadek poziomu akumulacji w porównaniu do kontroli. Co istotne, oba genotypy posiadały porównywalny poziom

enzymu w warunkach kontrolnych. Ponad 80% linii rekombinacyjnych cechował spadek poziomu ekspresji dwóch izoform tego białka, przy czym jedna z nich charakteryzowała się wysokim ujemnym efektem suszy i wykazywała interakcje genotyp \times susza. W przypadku opublikowanych doświadczeń prowadzonych na tolerancyjnej i wrażliwej odmianie jęczmienia, który wzrastał w warunkach wysokiego zasolenia gleby, także zaobserwowano zmiany w poziomie akumulacji fruktokinazy. Obie badane odmiany charakteryzowały się obniżonym profilem tego białka, jednakże u genotypu wrażliwego spadek był wyraźniejszy (Witzel i in., 2009). Przypuszcza się, że obniżony poziom ekspresji fruktokinazy może być związany z ograniczeniem procesu fotosyntezy i zmniejszoną syntezą skrobi, przez co komórki wykazują zwiększone zapotrzebowanie na fruktozę. Odmienny charakter odpowiedzi zaobserwowano w korzeniach tolerancyjnej odmiany ryżu wzrastającej w warunkach stresu chłodu (Lee i in., 2009).

W badanych liniach jęczmienia zidentyfikowano kilka izoform izomerazy trifosforanowej, kolejnego enzymu uczestniczącego w procesie glikolizy, który katalizuje przekształcenie fosfodihydroacetonu do aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Dwie izoformy tego białka wykazywały wzrost poziomu akumulacji w stosunku do kontroli, a dwie inne charakteryzowały się ujemnym efektem suszy. Syryjska linia rodzicielska wykazywała wzrost poziomu akumulacji tych białek, natomiast dla odmiany niemieckiej na żelu nie wykryto żadnej plamki odpowiadająca temu białku. Podwyższony poziom izomerazy trifosforanowej obserwowano u odpornej odmiany pszenicy poddawanej działaniu suszy (Budak i in., 2013), a także u tolerancyjnej na wysokie zasolenie odmianie kukurydzy (Zorb i in., 2010). Inne badania przeprowadzone na jęczmieniu wykazały, że odmiana wrażliwa wykazywała spadek poziomu akumulacji izomerazy trifosforanowej, w przeciwieństwie do odmiany tolerancyjnej, która odpowiadała wzrostem poziomu tego białka na deficyt wody (Wendelboe-Nelson i Morris, 2012).

Enolaza to przedostatni enzym szlaku glikolitycznego, którego ekspresja kontrolowana jest przez czynnik DREB1, regulujący ekspresję wielu genów zaangażowanych w odpowiedź roślin na stesy abiotyczne (Seki i in., 2002). Zmiany poziomu akumulacji tego białka charakteryzowały linie potomne M_{Cam}, dla których w większości obserwowano wzrost poziomu akumulacji, jednakże dla części genotypów nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy suszą i kontrolą. Linie CamB1/C1 cechował wyższy poziom akumulacji enolazy, w porównaniu do odmiany Maresi, która w warunkach suszy nie wykazała istotnych zmian w profilu akumulacji tego białka. Prowadzone równoległe analizy proteomiczne na liściach tego samego materiału

roślinnego wykazały, że poziom akumulacji enolazy znacznie wzrastał podczas odpowiedzi na suszę w linii hodowlanej Cam/B1/CI i części linii potomnych (Rodziewicz, 2014). Badania przeprowadzone na występującej w suchych obszarach afrykańskich roślinie z gatunku przypołudnika wykazały, że roślina ta w warunkach suszy i wysokiego zasolenia gleby zdolna jest do przeprowadzania fotosyntezy typu CAM (ang. *Crassulacean Acid Metabolism*), co czyni ją odporną na istniejące warunki środowiskowe. Wyniki przedstawione przez Forsthoefela i współpracowników (1995) wskazują na zwiększoną akumulację enolazy w korzeniach i liściach tych roślin w warunkach dużego stężenia soli oraz wzrost poziomu transkryptu tego białka w stresie suszy i chłodu, co świadczy o ważnej roli enolazy w procesach adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych (Forsthoefel i in., 1995). Biorąc pod uwagę opublikowane wyniki, a także zwiększony poziom akumulacji enolazy w korzeniach i liściach linii Cam/B1/CI, może sugerować lepszą adaptację tej odmiany do warunków ograniczonej dostępności wody.

Mutaza bisfosfoglicerynianowa niezależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu (iPGAM ang. *2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase*), jest glikolitycznym enzymem katalizującym konwersję 3-fosfoglicerynianu do 2-fosfoglicerynianu. Regulacja aktywności tego enzymu nie jest jak dotąd dobrze poznana. Przypuszcza się, że iPGAM pełni wielorakie funkcje, ponieważ obecność ubikwitynowanej formy tego białka zlokalizowano we wszystkich tkankach. Technologia z zastosowaniem antysensownych oligonukleotydów, wykazała, że rośliny ziemniaka o obniżonej ekspresji *iPGAM* charakteryzowały się zmniejszoną aktywnością fotosyntetyczną i szybkością wzrostu, jednakże zmiany te nie wpłynęły na zawartość skrobi w komórkach (Westram i in., 2002). Ponadto uważa się, że enzymy glikolityczne, włączając iPGAM, mają duży wpływ na ruchy aparatów szparkowych i produkcję biomasy. Powstające na skutek działania stresów zaburzenia komórkowe są efektem zmian w aktywności procesu glikolizy, co związane jest z zmniejszoną produkcją substratów do dalszych przemian metabolicznych i produkcji energii (Zhao i Assmann 2011). W przeprowadzonych w ramach tej pracy doświadczeniach, poziom akumulacji iPGAM znacząco zmieniał się na skutek działania stresu niedoboru wody. Genotypy rodzicielskie charakteryzowały się zwiększoną ilością tego enzymu w warunkach suszy, jednakże odmiana Maresi wykazywała pięciokrotnie wyższy wzrost niż linia CamB1/CI. W obrębie 90% linii potomnych znaleziono dwie izoformy enzymu, wykazujące bardzo wysoki dodatni efekt suszy. W mapowaniu markerami PQTL mającym na celu poszukiwania cech ilościowych związanych z odpornością kukurydzy na stres suszy wyselekcjonowano właśnie mutację

bisfosfoglicerynianową jako potencjalny biomarker warunkujący odporność roślin (de Vienne i in., 1999). W kilku opublikowanych dotąd pracach zidentyfikowano zmiany poziomu akumulacji iPGAM u różnych gatunków roślin w odpowiedzi na stresy abiotyczne. W przypadku dzikiego typu ryżu oraz transgenicznej linii z nadekspresją genu kodującego kinazę SnRK2 regulującą ścieżki sygnałne odpowiedzi roślin na stres solny, zaobserwowano, że zwiększoną akumulacją iPGAM charakteryzowała się roślina typu dzikiego (Nam i in., 2012). W badaniach przeprowadzonych na liściach soi poddawanej działaniu niedoboru wody zauważono znaczący spadek poziomu akumulacji tego białka w stosunku do kontroli (Alam i in., 2010). Podobne wyniki uzyskano dla rzodkiewnika wzrastającego w warunkach stresu chłodu (Amme i in., 2006). Jednakże w obu przypadkach badania prowadzone były na liściach, ponadto doświadczenia wykonywano na zaledwie jednym genotypie, który nie był scharakteryzowany pod kątem tolerancji na stres, dlatego na podstawie tych wyników trudno jest dyskutować o potencjalnej roli tego białka w adaptacji do zaistniałych warunków środowiskowych. W opublikowanych do tej pory pracach skupiających się na proteomie korzenia w warunkach stresów abiotycznych, nie przedstawiono iPGAM, jako białka różnicującego genotypy w odpowiedzi na zaistniały stres (Witzel i in., 2009; Sugimoto i Takeda, 2009; Lee i in., 2009).

Podczas przeprowadzonych doświadczeń, w korzeniach badanych odmian zidentyfikowano kilka kluczowych enzymów związanych z cyklem kwasów trikarboksylowych – dehydrogenazę pirogronianową, dehydrogenazę jabłczanową i akonitazę. Enzymy te katalizują szereg reakcji utleniania pirogronianu do dwutlenku węgla z wytworzeniem energii. Dehydrogenaza jabłczanowa w obrębie linii potomnych populacji M_{Cam} charakteryzowała się wysokim dodatnim efektem suszy. Oba genotypy rodzicielskie wykazywały względny wzrost ilości białka w porównaniu do kontroli, jednak linia CamB1/CI na poziomie kontroli wykazywały wyższy poziom tego białka niż odmiana Maresi. Dla zdecydowanej większości badanych genotypów profil akumulacji dehydrogenazy pirogronianowej i akonitazy pozostawał bez zmian, a tylko niewielka część populacji wykazywała efekty suszy. Dla porównania, w badaniach prowadzonych na kontrastujących genotypach jęczmienia poddawanego działaniu suszy obserwowano względny wzrost poziomu akumulacji tego enzymu u odmian tolerancyjnych, natomiast odmiany wrażliwe charakteryzowały się spadkiem lub brakiem znaczącej zmiany (Kausar i in., 2013; Ashoub i in., 2013). Zwiększony poziom transkryptów dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy jabłczanowej odnotowano u dwóch tolerancyjnych

odmian jęczmienia wzrastającego w warunkach deficytu wody, podczas gdy odmiana wrażliwa nie wykazywała reakcji na poziomie ekspresji tych genów (Guo i in., 2009).

Różnice w akumulacji białek uczestniczących w metabolicznych przemianach węgla, takich jak glikoliza, czy cykl Krebsa należą do zmian często obserwowanych podczas reakcji roślin na różne rodzaje stresów abiotycznych. Jednakże przedstawiane przez badaczy wyniki nie zawsze pokazują taką samą odpowiedź na stres, a obserwowane podczas poszczególnych doświadczeń zmiany w akumulacji tych enzymów są często przeciwstawne. Jedną z przyczyn uzyskiwania sprzecznych rezultatów mogą być różnice dotyczące zastosowanych warunków eksperymentalnych, co związane jest z intensywnością, czy długością trwania stresu. Niezwykle ważnym jest dobór odpowiedniego materiału roślinnego, a dodatkowym czynnikiem wpływającym na niejednorodny kierunek zmian proteomu może być faza rozwojowa rośliny, w której zainicjowany został stres. Interpretacja wyników na poziomie zmian profili białek uczestniczących w przemianach metabolicznych komórek jest trudna. Z jednej strony uważa się, że spadki poziomu akumulacji i aktywności enzymów zaangażowanych w proces glikolizy stanowią mechanizm związany z akumulowaniem cukrów, stanowiących rezerwuar energii, która wykorzystana zostanie po zaprzestaniu działania stresu. Z drugiej jednak strony podwyższona aktywność glikolityczna może związana być z większym zapotrzebowaniem komórek na energię, która niezbędna jest do utrzymania homeostazy komórkowej i aktywacji mechanizmów obronnych związanych z syntezą osmolitów, czy enzymów antyoksydacyjnych (Salekdeh i in., 2002; Kausar i in., 2013).

5.3. Białka związane z regulacją ekspresji genów

W odpowiedzi na zaistniały stres suszy następowały istotne statystycznie zmiany akumulacji białek zaangażowanych w regulację ekspresji genów. Analiza współrzędnych głównych PCO ujawniła wyraźne różnice w profilach takich białek wyizolowanych z korzeni poddanych działaniu suszy a kontrolnymi. Helikazy RNA to grupa białek pełniących wielorakie funkcje związane z regulacją ekspresji genów. Białka te wykazują zdolność wiązania RNA, a następnie katalizują reakcje rozplątywania dupleksów RNA z udziałem ATP. Uczestniczą w procesie dojrzewania RNA, biogenezie rybosomów, w regulacji transkrypcji i inicjacji procesu translacji. Stresy abiotyczne w znaczący sposób

wpływają na stabilność i strukturę mRNA, co związane jest z procesem biosyntezy białka. Uważa się, że helikazy RNA mogą odgrywać ważną rolę w regulacji ekspresji genów odpowiadających na stres solny, chłodu i suszy (Owtrim, 2006). Nadekspresja genu *MHI* kodującego helikazę 1 u rzodkiewnika związana była z poprawą kiełkowania nasion i wzrostu roślin w warunkach stresu oksydacyjnego, suszy i zasolenia. Transgeniczne rośliny wykazywały zwiększoną aktywność antyoksydacyjną i podwyższony poziom proliny, co wskazuje na znaczącą rolę helikazy w zdolności roślin do przeciwdziałania reaktywnym formom tlenu i dostosowania osmotycznego do zaistniałych warunków środowiska (Luo i in., 2009). Do rodziny helikaz RNA należy eukariotyczny czynnik inicjacji 4A (eIF-4A, ang. *Eukaryotic Initiation Factor-4A*), który odgrywa ważną rolę w inicjacji procesu translacji. Na skutek działania stresu dochodzi do tworzenia dwurzędowych struktur w rejonie 5'UTR – nieulegającej translacji sekwencji mRNA, co skutkuje obniżeniem wydajności procesu inicjacji translacji. eIF-4A wykazuje zdolność wiązania powstałych struktur, a następnie ich rozplątania, co w znaczący sposób ułatwia wiązanie się rybosomu i inicjację biosyntezy białka (Vashisht i Tuteja, 2005). U transgenicznych roślin tytoniu z nadekspresją genu kodującego helikazę PDH47 i PDH4, wykazujących znaczną homologię w stosunku do czynnika eIF-4A, zaobserwowano podwyższony poziom tolerancji na stres solny, a uzyskane rośliny potomne wzrastające w warunkach stresu wykazywały wysoki plon. Wyniki doświadczeń sugerują, że helikazy działają jako „białka opiekuńcze”, które poprzez naprawę struktur mRNA wpływają na wyższą wydajność procesu translacji i biosyntezy białka (Sanan-Mishra i in., 2005). W warunkach stresu ciepła w korzeniach pszenicy zaobserwowano wzmożony proces fosforylacji czynnika eIF-4A. Proces fosforylacji indukowany był w przypadku długotrwałego działania stresu, co może wskazywać na ważną rolę w procesie inicjacji biosyntezy białek obronnych, a tym samym adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych (Gallie i in., 1997). W przeprowadzonych doświadczeniach czynnik eIF-4A i zależna od ATP helikaza RNA z motywem DEAD-box różnicowały genotypy rodzicielskie i linie potomne populacji mapującej. Oba białka wykazywały istotny statystycznie wzrost profilu akumulacji u niemieckiej odmiany rodzicielskiej, natomiast linia CamB1/CI charakteryzowała się względnym spadkiem poziomu eukariotycznego czynnika inicjacji 4A. Świadczyłoby to o ograniczonej wydajności procesu biosyntezy białek, np. białek obronnych, u odmiany niemieckiej i konieczności wzmożonej akumulacji białek regulatorowych – czynnika eIF-4a i helikazy RNA pozwalających na prawidłowy przebieg procesu translacji. Podobne wyniki uzyskano wcześniej dla

jęczmienia wzrastającego w warunkach wysokiego zasolenia, u którego wzrost profilu akumulacji helikazy 1 charakteryzował liście i korzenie wrażliwego genotypu (Narita i in., 2004).

Eukariotyczny czynnik elongacyjny Tu (ang. *Elongation Factor-Tu*) to białko zlokalizowane w plastydach, chloroplastach i mitochondriach, gdzie odpowiada za wiązanie odpowiednich aminoacylo-tRNA podczas biosyntezy łańcucha polipeptydowego. Wykazano, że prokariotyczny czynnik elongacyjny Tu spełnia rolę białka opiekuńczego, zapobiegającego agregacji innych białek i posiadającego zdolność fałdowania zdenaturowanych białek. Ze względu na wysoki stopień homologii pomiędzy prokariotycznym i eukariotycznym czynnikiem Tu uważa się, że białko to może odgrywać ważną rolę w odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne, takie jak ekstremalne temperatury, suszę i zasolenie (Rao i in., 2004). W przypadku korzeni badanych odmian jęczmienia wzrost poziomu akumulacji tego białka dotyczył syryjskiej linii rodzicielskiej i połowy linii populacji mapującej. Dla odmiany Maresi nie odnotowano istotnych zmian we względnej ilości tego białka. Zmiany poziomu akumulacji białka Tu obserwowano wcześniej u różnych odmian kukurydzy poddawanej działaniu stresu chłodu. Wzrost poziomu transkryptu i białka charakteryzował odmiany odporne (Momcilovic i Ristic, 2007). Podwyższony profil akumulacji czynnika Tu obserwowano także w liściach tolerancyjnej odmiany jęczmienia (Ashoub i in., 2013) i ryżu (Salekdeh i in., 2002), poddawanych działaniu stresu suszy. W przypadku liści ciecierzycy wykazującej wysoki poziom tolerancji na deficyt wody odnotowano aż 15-krotny wzrost poziomu akumulacji czynnika Tu (Jain i Chattopadhyay, 2010). Akumulowanie zwiększonych ilości tego białka u odmian odpornych w porównaniu do form wrażliwych może być związane ze wzmożoną syntezą innych białek obronnych, które w znaczący sposób niwelują negatywne skutki działania stresu (Mohammadi i in., 2012). W przypadku transgenicznej pszenicy z nadekspresją genu kodującego plastydowy czynnik elongacyjny Tu zaobserwowano, że w warunkach wysokich temperatur rośliny charakteryzowały się mniejszym stopniem uszkodzeń błon tylakoidów, niższym poziomem zagregowanych białek w obrębie liści i wyższym poziomem aktywności fotosyntetycznej po ustąpieniu działania stresu, w porównaniu do roślin typu dzikiego. Wykazano także, że rośliny transgeniczne charakteryzowały się wyższym tempem regeneracji, co może wskazywać na istotne powiązanie molekularne pomiędzy poziomem białka Tu a odpornością na stresy abiotyczne (Fu i in., 2008).

5.4. Białka związane z metabolizmem wtórnym

Zastosowane warunki suszy wpłynęły na zmianę poziomu akumulacji białek związanych z metabolizmem wtórnym – głównie amoniakolizy fenyloalaniny (PAL, ang. *Phenylalanine Ammonia Lyase*), a także reduktazy izoflawonowej i *O*-metylotransferazy kwasu kawowego. Analiza PCO ujawniła istotne statystycznie zmiany w profilu akumulacji pomiędzy warunkami suszy i kontrolą, których kierunek w obrębie badanych genotypów był bardzo podobny. Genotypy rodzicielskie i odmiana referencyjna Stratus wykazywały znaczące spadki w poziomie akumulacji różnych izoform tych białek, jednakże charakter zmian u odmian europejskich był znacznie bardziej wyraźny niż u syryjskiej linii rodzicielskiej. Susza wpłynęła na zmiany akumulacji badanych enzymów metabolizmu wtórnego w 85% linii wsobnych populacji MCam, a po jednej z izoform PAL i *O*-metylotransferazy kwasu kawowego wykazywało bardzo wysokie ujemne efekt suszy i silną interakcję pomiędzy genotypem i stresem. PAL jest kluczowym enzymem szlaku fenylopropanoidowego, w którym katalizuje reakcje przemiany fenyloalaniny do amoniaku i kwasu *trans*-cynamonowego. *O*-metylotransferaza jest kolejnym enzymem szlaku, który katalizuje przekształcenie kwasu kawowego do kwasu ferulowego. Produktami szlaku fenylopropanoidowego są różne klasy fenolowych metabolitów wtórnych, takie jak np. flawonoidy, ligniny, czy fenylopropanoidy, które odgrywają bardzo ważne role w odpowiedzi roślin na działanie stresów środowiskowych (Dixon i Paiva, 1995). Poziom akumulacji enzymów tego szlaku może stanowić wskaźnik biosyntezy związków fenolowych, a tym samym określać stopień odpowiedzi rośliny na określony stres. I tak przykładowo zmiana poziomu lignifikacji ścian komórkowych stanowi ważny mechanizm adaptacji roślin do niesprzyjających warunków środowiskowych. Odkładanie lignin prowadzi do usztywnienia ścian komórkowych, a tym samym do ich wzmocnienia przed szkodliwym działaniem suszy, czy wysokiego zasolenia gleby. Wzmocniona synteza *O*-metylotransferazy kwasu kawowego w korzeniach kukurydzy w warunkach stresu solnego związana była ze zwiększoną syntezą lignin, a tym samym zwiększoną ochroną przed procesem dehydratacji komórek (Degenhardt i in., 2000). Jednakże inne hipotezy sugerują, że sztywnienie ścian komórkowych w strefie korzenia może wpływać na ograniczenie jego wzrostu oraz na utrudnioną penetrację gleby w warunkach stresu oksydacyjnego (Lee i in., 2007). Podwójne mutanty *pall pal2* rzodkiewnika wzrastające w warunkach wysokiego stężenia soli nie wykazywały żadnych istotnych różnic fenotypowych w stosunku do roślin typu dzikiego. W przypadku stresu suszy rośliny charakteryzowały się zmniejszoną

zawartością lignin o 30% w porównaniu do kontroli, jednakże ich wzrost nie został zahamowany i przeciwnie do roślin typu dzikiego wykazywały nieco zwiększoną odporność na deficyt wody (Huang i in., 2010). Analiza zmian profilu akumulacji PAL u kukurydzy poddawanej niedoborowi wody wykazała, że podwyższony poziom enzymu charakteryzował liście, natomiast w korzeniach białko to nie wykazywało istotnych statystycznie zmian w profilu akumulacji (Ashraf, 2011). Ponadto uważa się, że produkty szlaku fenylopropanoidowego mogą odgrywać ważną rolę w usuwaniu nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu, tym samym pełniąc rolę alternatywnego mechanizmu przeciwutleniającego komórki (Grace i Logan, 2000).

5.5. Inne białka

Analiza PCO dla wszystkich białek należących do kategorii funkcyjnych związanych z metabolizmem azotu i transportem elektronów nie ujawniła znaczących statystycznie różnic pomiędzy warunkami suszy i kontroli. Jednakże białko uczestniczące w metabolicznych przemianach azotu – syntaza *S*-adenozylometioninowa wykazywała istotny statystycznie wysoki dodatni efekt suszy oraz silną interakcję genotyp \times susza w znaczącej liczbie linii populacji mapującej i u odmiany rodzicielskiej Maresi. *S*-adenozylometionina powstaje w cyklu aktywnego metylu, gdzie konwertowana jest z metioniny przy udziale syntazy *S*-adenozylometioniny. Związek ten dostarcza grupy metylowe do syntezy białek, kwasów nukleinowych i metabolitów, m.in. lignin, alkaloidów oraz związków osmotycznie czynnych – betainy, czy poliamin (Espartero i in., 1994). Zmiany poziomu akumulacji innych enzymów uczestniczących w syntezie i przemianach metioniny – syntazy metioninowej i *S*-adenozylotransferazy metioninowej odnotowano w liściach tego samego materiału roślinnego. Podobnie jak w przypadku proteomu korzenia – odmiana rodzicielska Maresi i część linii rekombinacyjnych charakteryzowała się wzrostem względnej ilości tych białek u roślin poddawanych działaniu suszy (Rodziewicz, 2014), co może świadczyć o zwiększonym zapotrzebowaniu tych roślin na grupy metylowe, które w wyniku dalszych przemian wykorzystywane są do syntezy związków obronnych, między innymi osmoprotektantów, odgrywających kluczową rolę w przeżyciu niekorzystnych warunków środowiskowych. Indukcję syntazy *S*-adenozylometioniny obserwowano w korzeniach jęczmienia o dwóch kontrastujących

genotypach wzrastającego w warunkach wysokiego zasolenia gleby, jednakże znacznie wyższy poziom akumulacji tego enzymu cechował odmianę wrażliwą (Witzel i in., 2009), co w odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej pracy świadczyłoby o mniejszej tolerancji odmiany Maresi na deficyt wody. W przypadku nadekspresji genu kodującego syntazę *S*-adenozylometioniny u rzodkiewnika zaobserwowano zwiększoną odporność rośliny na stres suszy i zasolenia, która związana była ze wzmożoną transkrypcją genów zależnych od ABA, a także zwiększoną syntezą etylenu, co może świadczyć o udziale tego białka w reakcjach roślin na stresy abiotyczne jak i biotyczne (Kim i in., 2015). Ponadto, indukcję genu syntazy metioninowej odnotowano w liściach jęczmienia poddawanego działaniu m.in. suszy, zasolenia i niskich temperatur, a w rezultacie zaobserwowano wzrost akumulacji betainy glicynowej – powstającej z choliny, której synteza związana jest z dostarczeniem grup metylowych z cyklu aktywnego metylu. Takie obserwacje mogą świadczyć o wspólnym mechanizmie regulacji przemian metioniny i syntezy betainy glicynowej w warunkach stresów abiotycznych (Narita i in., 2004).

Bardzo wysokim dodatnim efektem suszy i interakcją pomiędzy genotypem i suszą w obrębie populacji mapującej i osobników rodzicielskich charakteryzowało się niezidentyfikowane w pełni białko, posiadające domenę hydrolazy trifosfonukleotydów z motywem P-loop. Domena hydrolazy NTP jest jedną z najczęściej występujących sekwencji białkowych, znajdujących się w 5-10% produktów genów w genomie eukariotycznym i prokariotycznym. Jej funkcja związana jest z hydrolizą wiązania fosforanowego w obrębie trifosfonukleotydów, a w szczególności ATP i GTP. Energia uzyskana z hydrolizy wiązania wykorzystywana jest do zmian konformacyjnych białka, co związane jest z uzyskaniem jego pełnej aktywności. Sugeruje się, że domeny te mogą odrywać ważną rolę w procesie programowanej śmierci komórek, w regulacji ścieżek sygnałnych i w odpowiedzi na stresy środowiskowe roślin (Leipe i in., 2004). Jednakże jak dotąd nie ukazały się prace skupiające się na potencjalnym związku białek z domeną NTPazową, a odpowiedzią roślin na stresy abiotyczne. Jak wspomniano powyżej, w niniejszej pracy nie udało się w pełni zidentyfikować białka zawierającego domenę NTPazową z motywem P-loop reprezentującego jedną z plamek na elektroforegramie, która wykazywała istotną reakcję na suszę. Ze względu na silną odpowiedź tego białka na zastosowany stres w ponad połowie badanych genotypów, a także interakcje genotyp \times susza należałoby ponowić próby jego identyfikacji w dalszych badaniach prowadzonych na jęczmieniu.

W odpowiedzi na stres suszy zmianę poziomu akumulacji wykazały podstawowe białka budujące cytoszkielet komórkowy – tubulina, aktyna i formina. Zarówno mikrotubule budowane przez tubuliny i mikrofilamenty aktynowe są strukturami nadającymi mechaniczną wytrzymałość komórce roślinnej, wspomagają syntezę ściany komórkowej, uczestniczą w procesach mitozy i cytokinezy. Ponadto uważa się, że działają one jako sensory odbierające sygnały związane z pojawiającym się stresem osmotycznym (Nick, 2013). W przypadku badanych odmian jęczmienia zaobserwowano istotny spadek poziomu akumulacji tych białek u niemieckiej odmiany rodzicielskiej i części linii rekombinacyjnych. Podobne wyniki uzyskano w przypadku wrażliwej odmiany rzepaku (Mohammadi i in., 2012) i jęczmienia (Kausar i in., 2013), które wzrastały w warunkach niedoboru wody. Sugeruje się, że obniżony poziom białek cytoszkieletu może przyczynić się zaburzenia tworzenia wrzeciona kariokinetycznego, ograniczenia procesu mitozy, co prowadzić może do ograniczenia wzrostu rośliny (Mohammadi i in., 2012).

W obrębie badanych odmian wysokim dodatnim efektem suszy charakteryzowało się białko regulatorowe z rodziny białek 14-3-3. Białka 14-3-3 to rodzina wysoko zachowawczych molekuł, które wykazują zdolność wiązania fosforylowanych reszt treoniny i/lub seryny, regulując w ten sposób ścieżki sygnałne i metabolizm komórek. Białka te odgrywają ważną rolę w regulacji odpowiedzi roślin na stesy środowiskowe, poprzez m.in. regulację aktywności białek sygnałnych, regulację ekspresji genów aktywowanych w warunkach stresu, czy modulację czynników transkrypcyjnych (Chen i in., 2006). W warunkach stresu osmotycznego zaobserwowano wzmożoną syntezę błonowych białek 14-3-3, które wiążąc fosforylowane łańcuchy V-ATPazy, tworzą kompleksy V-ATPaza/14-3-3, zwiększając aktywność pomp protonowych, pełniących kluczową rolę w mechanizmie adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. Wakuolarne pompy protonowe (V-ATPazy) zaangażowane są w regulację wewnątrzkomórkowego pH, w procesy regulowania turgoru, osmoregulację i zależną od Ca^{+} transdukcję sygnału (Roberts i in., 2002). W badaniach transgenicznej trzciny cukrowej z nadekspresją genów kodujących białka 14-3-3 w warunkach stresu osmotycznego, obserwowano zwiększoną aktywność pomp protonowych, co związane było z lepszym utrzymaniem turgoru i mniejszym stopniem wędnięcia roślin w porównaniu do form typu dzikiego (Babakov i in., 2000). W przypadku korzeni badanych odmian jęczmienia wysokim dodatnim efektem suszy w obrębie 30% populacji mapującej charakteryzowało się zarówno białko regulatorowe 14-3-3 jak i podjednostka A wakuolarnej ATP-azy. Wśród genotypów rodzicielskich zmiany poziomu akumulacji tych

białek widoczne były w korzeniach odmiany Maresi. Zmiany te świadczyć mogą o gorszym przystosowaniu tych linii do zaistniałych warunków środowiskowych i konieczności uaktywniania mechanizmów obronnych pozwalających utrzymać m.in. odpowiedni potencjał wody w komórce. Sugeruje się, że białka z rodziny 14-3-3 w znaczącym stopniu regulują aktywność mitochondrialnej i chloroplastowej syntazy ATP w warunkach niedotlenienia korzeni i braku substancji odżywczych (Bunney i in., 2001).

5.6. Zidentyfikowane białka a potencjalne biomarkery suszy

Na skutek działania stresu suszy dochodzi do zaburzenia podstawowych procesów prawidłowego funkcjonowania komórek. Odpowiedź roślin na suszę oraz mechanizm jej tolerowania jest złożonym procesem przebiegającym na wielu poziomach organizacji komórki, w które zaangażowanych jest wiele genów i mechanizmów biochemiczno-molekularnych. Rozwój nowoczesnych technik pozwala na identyfikację coraz większej liczby genów, transkryptów, białek czy metabolitów wykazujących zmiany w odpowiedzi na działający czynnik stresowy. Szeroko pojęta biologia systemów pozwala na korelacje danych pochodzących z różnych poziomów molekularnych i poznanie złożonych sieci oddziaływań biorących udział w regulacji odpowiedzi roślin na stres. Zmiany zachodzące na poziomie proteomu mogą stanowić ważne narzędzie wykorzystywane w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów związanych z podwyższoną tolerancją rośliny na określony stres. Wyselekcjonowanie takich białek, które mogłyby stanowić wskaźniki poziomu odporności rośliny nie należy do zadań łatwych, m.in. ze względu na liczbę badanych obiektów. Z punktu widzenia statystyki wytypowanie białek-kandydatów jest możliwe tylko w przypadku analizy dużej liczby obiektów. Badania proteomiczne prowadzone na niewielkiej liczbie genotypów pozwalają tylko na wyróżnienie białek reagujących na suszę, czyli tych, które wykazują różnice pomiędzy rośliną kontrolną a stresowaną. Jednakże wytypowanie białek, których zmiany profilu akumulacji w suszy mogłyby wykazywać interakcje z potencjałem genetycznym odmiany możliwe jest w przypadku analiz prowadzonych na większej liczbie osobników. Zastosowanie odpowiednich metod oceny statystycznej pozwala na rozróżnienie takich białek, które wykazują zmiany pod wpływem działania suszy oraz tych, które dodatkowo różnicują genotypy między sobą i mogą być związane z genetycznymi uwarunkowaniami odporności rośliny na suszę.

Należy także podkreślić fakt, że większość opublikowanych prac proteomicznych w warunkach stresów abiotycznych odnosi się do badań części nadziemnych roślin, a w szczególności liści. Z tego względu wyniki uzyskane w niniejszej pracy w wielu przypadkach porównywane są z danymi literaturowymi z poziomu liści jęczmienia i innych roślin uprawnych. W wielu przypadkach kierunek zmian w poziomie akumulacji poszczególnych białek obecnych w korzeniach i liściach był zbliżony, co dotyczy m.in. białek szoku cieplnego. Jednakże odnosząc się do zmian w profilach ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, czy peroksydazy askorbinianowej można dostrzec zupełnie przeciwną odpowiedź w obrębie tych tkanek, a niezgodności te mogą wynikać z różnic w podstawowych funkcjach pełnionych przez te organy. Zmniejszona aktywność działania systemu antyoksydacyjnego związana jest z generowaniem nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu powstających m.in. na skutek aktywności fotosyntetycznej liści w warunkach stresu, co w przypadku korzenia mogłoby tłumaczyć brak zmian lub spadki w poziomie akumulacji tych enzymów.

Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy proteomiczne korzeni jęczmienia ujawniły, że reakcje na suszę odmian rodzicielskich wykazywały pewne istotne różnice. W wielu przypadkach obserwowaliśmy ten sam kierunek zmian, jednakże z różnym poziomem intensywności tej zmiany, co sugeruje o silnie konserwatywnej odpowiedzi proteomu korzenia na niedobór wody. Dlatego też większość zidentyfikowanych w pracy białek należałoby traktować jako wskaźniki zaistnienia suszy. Liczba białek wykazujących efekt suszy w obu odmianach była podobna, aczkolwiek odnosząc się do poszczególnych białek wykazujących bardzo duże dodatnie/ujemne efekty suszy i interakcje pomiędzy suszą a genotypem można dostrzec istotne różnice w reakcjach obu genotypów. Analizując zmiany poziomu akumulacji tych białek można zauważyć, że odmiana Maresi wykazywała tendencje do wyższych wzrostów w warunkach suszy, przy czym często linia CamB1/CI charakteryzowała się wyższym profilem akumulacji w odniesieniu do roślin kontrolnych. Taki charakter zmian zauważalny był w przypadku grupy funkcyjnej obejmującej białka pełniące role obronne. Przykład może stanowić białko szoku cieplnego 16.9 kDa, którego wzrost u odmiany Maresi w warunkach deficytu wody kilkukrotnie przewyższał wzrost w linii syryjskiej, jednakże poziom białka u roślin kontrolnych wykazywał odwrotną tendencję. Taki charakter odpowiedzi może świadczyć o lepszym przystosowaniu się odmiany syryjskiej do niekorzystnych warunków środowiskowych i mniejszych potrzebach uruchamiania mechanizmów obronnych w porównaniu do odmiany niemieckiej, co wynikać może z różnic w pochodzeniu geograficznym tych genotypów.

Geny kodujące niektóre białka wykazujące w niniejszej pracy interakcje pomiędzy suszą a genotypem były wcześniej wykorzystywane przez inne zespoły badawcze do tworzenia roślin genetycznie modyfikowanych, wykazujących zwiększoną tolerancję na stres, m.in. suszy, co świadczy o ogromnym potencjale tych białek i ich udziale w mechanizmach adaptacyjnych roślin. Jednakże ze względu na złożoność mechanizmów odpowiedzi roślin na stres, wyróżnienie wśród zidentyfikowanych białek takich, które mogą być potencjalnymi markerami wymaga korelacji danych uzyskiwanych na różnym poziomie molekularnych. Systemowe podejście, uwzględniające korelację danych z poziomu genomu, transkryptomu, proteomu, metabolomu w połączeniu z danymi fizjologiczno-morfologicznymi i właściwościami otrzymywanego plonu pozwoli na uzyskanie pełnego obrazu zachodzących zmian i identyfikację markerów związanych z tym stresem.

6. WNIOSKI

1. Zastosowane w doświadczeniu warunki suszy pozwoliły na analizę reakcji jęczmienia na poziomie proteomu korzenia, a uzyskane wyniki potwierdziły fakt, że niedobór wody ma duży wpływ na zmianę profilu akumulacji białek u roślin.
2. Dzięki wykorzystaniu dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym i technik spektrometrii mas możliwe było wyselekcjonowanie i zidentyfikowanie znacznej części białek wykazujących zmiany w poziomie akumulacji w odpowiedzi na suszę.
3. Różnice pomiędzy reakcją proteomu linii CamB1/CI a zmianami obserwowanymi w warunkach suszy dla proteomów odmian europejskich (Maresi, Sebastian, Stratus) mogą być związane z pochodzeniem geograficznym tej odmiany i wynikać z jej lepszego przystosowania do wzrostu w warunkach deficytu wody.
4. Ocena istotności zmian profili akumulacji białek dla dużej liczby badanych genotypów (populacji mapującej) nie może być wykonana za pomocą powszechnie dostępnego oprogramowania komputerowego i wymaga zastosowania dodatkowych narzędzi bioinformatycznych oraz odpowiednich metod oceny statystycznej.
5. Przeprowadzona ocena statystyczna wyników uzyskanych dla linii populacji mapującej pozwoliła podzielić zidentyfikowane białka na takie, które wykazują zmiany w profilu akumulacji pod wpływem działania suszy oraz takie, które dodatkowo różnicują genotypy między sobą i mogą być związane z genetycznymi uwarunkowaniami odporności rośliny na suszę. Tego typu dogłębna analiza nie jest możliwa w przypadku wyników uzyskanych dla kilku genotypów.

6. Obserwowane zmiany poziomu akumulacji białek w odpowiedzi na niedobór wody (efekt suszy), jak i zmiany pomiędzy badanymi genotypami a suszą (interakcja genotyp \times susza), sugerują o złożonych mechanizmach aklimatyzacyjnych i adaptacyjnych poszczególnych genotypów należących do tego samego gatunku.
7. Białka wykazujące istotne efekty interakcji genotyp \times susza mogą stanowić potencjalne markery związane z tolerancją roślin na stres suszy. Należą do nich: białka obronne, regulujące ekspresję genów, zaangażowane w metabolizm węgla, czy metabolizm wtórny. Na szczególną uwagę zasługują białka o bardzo silnych efektach suszy, m.in. białko szoku cieplnego 16.9 kDa i mutaza bisfosfoglicerynianowa.
8. Analiza proteomu korzenia w porównaniu z proteomem liścia wskazała pewne różnice w kierunku zmian akumulacji białek, co związane może być z różnicami w podstawowych funkcjach pełnionych przez te organy.
9. Podobny kierunek zmian białek różnicujących odmiany rodzicielskie, referencyjne i linie populacji mapującej jęczmienia wskazuje na konserwatywną odpowiedź tego gatunku na stres suszy.
10. Grupowanie hierarchiczne ujawniło, że biorąc pod uwagę zmiany wywołane suszą w proteomie korzenia, linie populacji mapującej MCam można podzielić na dwie wyraźne grupy skupione wokół genotypów rodzicielskich, co związane jest prawdopodobnie z częstością występowania alleli po jednym lub drugim rodzicu.
11. Zmiany poziomu akumulacji białek korzenia wykazujących interakcje pomiędzy suszą a genotypem powinny zostać skorelowane z danymi uzyskanymi z innych zadań projektu POLAPGEN-BD, m.in. danymi genetycznymi, metabolomicznymi, morfologicznymi, a w szczególności z danymi dotyczącymi plonu, w celu oceny ich przydatności do selekcji odmian uprawnych odpornych na suszę.

7. STRESZCZENIE

Rośliny rosnące w warunkach naturalnych nieustannie narażone są na działanie różnego rodzaju czynników zewnętrznych, zarówno biotycznych jak i abiotycznych. Susza jest jednym ze stresów abiotycznych, która znacząco wpływa na wzrost i rozwój roślin, przez co ogranicza produkcję rolną i przyczynia się do poważnych strat ekonomicznych. Odpowiedź roślin na niekorzystne warunki środowiska jest zjawiskiem angażującym wiele mechanizmów biochemiczno-molekularnych, do których należą zmiany poziomu ekspresji genów, różnice w profilu akumulacji specyficznych białek, czy metabolitów. Rozwój nowoczesnych technik separacji oraz identyfikacji dużej liczby białek metodami spektrometrii mas sprawił, że proteomika stała się użytecznym narzędziem wykorzystywanym w poszukiwaniu potencjalnych białek-markerów związanych z tolerancją roślin uprawnych na stresy. Jednakże pomimo intensywnych badań, mechanizmy leżące u podstaw tolerowania stresów abiotycznych przez rośliny nie są jak dotąd dobrze poznane.

Nadrzędnym celem przedłożonej pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie białek korzenia zaangażowanych w molekularne mechanizmy odpowiedzi jęczmienia jarego na warunki deficytu wody. Analizy prowadzono na dwóch genotypach rodzicielskich: Maresi i CamB1/CI, 89 rekombinacyjnych liniach wsobnych pochodzących ze skrzyżowania osobników rodzicielskich i dwóch odmianach referencyjnych: Sebastian i Stratus. Wykorzystane narzędzia proteomiczne i wysokorozdzielcze techniki spektrometrii mas pozwoliły na sporządzenie map proteomicznych korzeni jęczmienia oraz identyfikację szeregu specyficznych białek reagujących zmianą poziomu akumulacji w warunkach niedoboru wody.

Zastosowane w przeprowadzonych doświadczeniach warunki suszy wpłynęły w znaczący sposób na zmiany proteomu korzenia dla wszystkich badanych genotypów jęczmienia, co wskazuje, że niedobór wody ma ogromny wpływ na zmiany w poziomie akumulacji białek u roślin. Zastosowanie odpowiednich metod oceny statystycznej pozwoliło na wyselekcjonowanie zarówno białek wykazujących zmiany poziomu akumulacji pod wpływem suszy (efekt suszy), jak i białek, których zmiany w profilu ekspresji są efektem interakcji suszy i genotypu. Należą do nich: białka obronne,

regulujące ekspresje genów, zaangażowane w metabolizm węgla, czy metabolizm wtórny. Białka wykazujące istotne efekty interakcji suszy i genotypu mogą stanowić potencjalne białkowe markery związane z tolerancją roślin na stres suszy. Uzyskane w tej pracy wyniki na poziomie proteomu korzenia powinny zostać skorelowane z rezultatami innych zadań realizowanych w projekcie POLAPGEN-BD, m.in. z danymi genetycznymi, metabolomicznymi, morfologicznymi, a w szczególności z danymi dotyczącymi plonu w celu oceny ich przydatności do selekcji odmian uprawnych odpornych na suszę.

8. LITERATURA

Alam I., Sharmin S.A., Kim K.H., Yang J.K., Choi M.S., Lee B.H. (2010) Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress, *Plant and Soil* 333, 491-505.

Alvarez S., Roy Choudhury, S., and Pandey S. (2014) Comparative Quantitative Proteomics Analysis of the ABA Response of Roots of Drought-Sensitive and Drought-Tolerant Wheat Varieties Identifies Proteomic Signatures of Drought Adaptability, *J. Proteome Res.* 13, 1688–1701.

Alvim F.C., Carolino S.M., Cascardo J.C., Nunes C.C., Martinez C.A., Otoni W.C., Fontes E.P. (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress, *Plant Physiol.* 126, 1042–1054.

Al-Whaibi M.H. (2011) Plant heat-shock proteins: A mini review, *J. King Saud University-Science* 23, 139–150.

Amme S., Matros A., Schlesier B., Mock H.P. (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology, *Journal of Experimental Botany*, 57, 1537–1546.

Amudha J., Balasubramani G. (2011) Recent molecular advances to combat abiotic stress analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress, *Plant and Soil* 333, 491-505.

Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P., Royo C. (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* 89, 925–940.

Ashoub A., Beckhaus T., Berberich T., Karas M., Brüggemann W. (2013) Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress, *Planta* 237, 771–781.

Ashraf G. (2011) Effects of drought on the activity of phenylalanine ammonia lyase in the leaves and roots of maize inbreds, *Aust J Basic Appl Sci* 5, 952–956.

Ashraf M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances, *Biotechnol. Adv.* 28, 169–183.

Athar H.R., Ashraf M. (2009) Strategies for crop improvement against salinity and drought stress: an overview, *W: Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency*, Ashraf, M., Ozturk, M., Athar, H.R. Springer Verlag, New York, USA, 1-16.

Atteya A.M. (2003) Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress, *Bulg. J. Plant Physiol*, 29, 63-76.

- Babakov A.V., Chelysheva V.V., Klychnikov O.I., Zorinyanz S.E., Trofimova M.S., De Boer, A.H. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in the osmotic regulation of H⁺-ATPase in plant plasma membranes, *Planta* 211, 446–448.
- Babu R.C., Zhang J., Blum A., Ho T.H.D., Wu R., Nguyen H.T. (2004) HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection, *Plant Sci* 166, 855–62.
- Badawi G.H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K., Tanaka K. (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts, *Plant Sci.* 166, 919-928.
- Badawi G.H., Kawano N., Yamauchi Y. (2004) Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit, *Physiol Plant* 121, 231–8.
- Baerenfaller K., Grossmann J., Grobei M.A., Hull R., Hirsch-Hoffmann M., Yalovsky S., Zimmermann P., Grossniklaus U., Gruissem W., and Baginsky S. (2008) Genome-Scale Proteomics Reveals Arabidopsis thaliana Gene Models and Proteome Dynamics, *Science* 320, 938–941.
- Baik B.K., Ullrich S.E. (2008) Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science* 48, 233–242.
- Baker J., Van dennSteele C., Dure L. (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton, *Plant Molecular Biology* 11, 277-291.
- Barbier-Brygoo H., Joyard J. (2004) Focus on plant proteomics, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 913–917.
- Barnabas B., Jagner K., Feher A. (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals, *Plant Cell Environ.* 31, 11-38.
- Basnayake J., Fukai S., Ouk M. (2006) Contribution of potential yield, drought tolerance and escape to adaptation of 15 rice varieties in rainfed lowlands in Cambodia. Proceedings of the Australian Agronomy Conference, Australian Society of Agronomy, Birsbane, Australia.
- Beale, E.M., Little, R.J. (1975). Missing values in multivariate analysis, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 129–145.
- Bedell J.A., Budiman M.A., Nunberg A., Citek R.W. (2005) Sorghum genome sequencing by methylation filtration, *PLoS Bio.* 3, 1-3.
- Bengtsson M, Shen Y, Oki T. (2006) A SRES-based gridded global population data set for 1990-2100, *Popul. Environ.* 28, 113-131.

- Bernier J., Kumar A., Venuprasad R., Spaner D., Atlin G. (2007) A large-effect QTL for between relative water content and growth parameters in barley: a QTL study, *New Biochem J*, 349, 309–321.
- Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan I. (2003) The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003, *Nucleic Acids Res.* 31, 365–370.
- Bohnert H.J., Jensen R.G. (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants, *Trends Biotechnol* 14, 89–97.
- Bolewll P., Slabas T., Whitelegge J. P. (2004) Proteomics: empowering systems biology in plants, *Phytochemistry* 65, 1665–1669.
- Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants, *Plant Molecular Biology* 32, 191–222.
- Bota J., Flexas J., Medrano H. (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* 162, 671–681.
- Bray E.A. (1993) Molecular Responses to Water Deficit, *Plant Physiol.* 103, 1035–1040.
- Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit, *Trends in Plant Science* 2, 48–54.
- Bray E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk E. (2000) Responses to abiotic stress. In *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1st ed.; Buchanan. B.B.; Gruissen, W.; Jones, R.L.; Rockville, Maryland, USA, 2000, 1158–1249.
- Budak H., Akpinar B.A., Unver T., Turktas M. (2013) Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS, *Plant Mol Biol.* 83, 89–103.
- Bunney T.D., van Walraven H.S., de Boer, A.H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4249–4254.
- R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. ISBN 3-900051-07-0, www.R-project.org.
- Catherman A.D., Skinner O.S., Kelleher N.L. (2014) Top Down proteomics: Facts and perspectives, *Adv. OMICs-Based Discip.* 445, 683–693.
- Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Mare C., Tondelli, A., Stanca M., (2010) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics, *Field Crops Research* 105, 1–14.
- Chang W.W., Huang L., Shen M., Webster C., Burlingame A.L., Roberts J.K. (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings

- acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry, *Plant Physiol.* 122, 295-318.
- Chavez M.C., Marco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant responses to drought-from genes to whole plant, *Functional plant biology* 30, 239-264.
- Chen T.H.H., Murata N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes, *Current Opinion in Plant Biology* 5 , 250–257.
- Chen F., Li Q., Sun L., He Z. (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to abiotic and biotic stress, *DNA Research*, 13, 53-63.
- Chen T.H., Murata N. (2011) Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications, *Plant Cell Environ* 34, 1–20.
- Cho E.K., Hong C.B. (2006) Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants, *Plant Cell Rep* 25, 349–358.
- Clarke A.K. (1999) ATP-dependent Clp proteases in photosynthetic organisms – A cut above the rest! *Ann Bot* 83, 593–599.
- Coetzer N., Gazendam I., Oelofse D., Berger D.K. (2010) SSHscreen and SSHdb, generic software for microarray based gene discovery: application to the stress response in cowpea, *Plant Methods* 1, 6-10.
- Costa P., Bahrman N., Frigerio J.M., Kremer A., Plomion C. (1998) Water-deficit-responsive proteins in maritime pine, *Plant Mol. Biol.* 38, 587-596.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.* 57, 449–459.
- Creese A.J., Cooper H.J. (2007) Liquid chromatography electron capture dissociation tandem mass spectrometry (LC-ECD-MS/MS) versus liquid chromatography collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (LC-CID-MS/MS) for the identification of proteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 891–897.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57, 779-795.
- De Leonardis A.M., Petrarulo M., De Vita P., Mastrangelo A.M. (2012) Genetic and molecular aspects of plant response to drought in annual crop species. W: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Montanaro G., Dichio B. InTech, Rijeka, 45–74.
- de Vienne D., Leonardi A., Damerval C., Zivy M. (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize, *Journal of Experimental Botany* 332, 303–309.

- Degenhardt B., Gimmler H. (2000) Cell wall adaptation to multiple environmental stresses in maize roots, *J. Exp. Bot.* 51, 595–603.
- del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J. Exp. Bot.* 53, 1255–72.
- Delauney A.J., Verma D.P.S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.* 4, 215–223.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Feller, U. (2008). RuBisCO and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties, *Plant Growth Regul.* 56, 97–106.
- Dietz K.J. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, *J. Exp. Bot.* 57, 1697–1709.
- Dixon R.P., Paiva N.L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, *Plant Cell Online* 7, 1085–1097.
- Dixon D.P., Steel, P.G., Edwards, R. (2011) Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling, *Plant Signal. Behav.* 6, 1223–1227.
- Dure L., Crouch M., Harada J., Ho D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants, *Plant Molecular Biology* 12, 475–486.
- Duvick J., Fu A., Muppirala U., Sabharwal M., Wilkerson M.D., Lawrence C.J., Lushbough C., Brendel V. (2008) Plant GDB: a resource for comparative plant genomics, *Nucleic Acids Res.* 36, 959–965.
- Eckerskorn C., Jungblut P., Mewes W., Klose J., Lottspeich F. (1988) Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis, *Electrophoresis* 9, 830–838.
- 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.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management, *Agronomy for Sustainable Development* 29, 185–212.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 246, 64–71.
- Fink A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding, *Physiol Rev.* 79, 425–49.

- Finkelstein R.R., Gampala S.S.L, Rock C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings, *Plant Cell* 14, 15–45.
- Ford K.L, Cassin A., Bacic A. (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance, *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2011.00044.
- Forsthoefel N.R., Cushman M.A., Cushman J.C. (1995) Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum Crystallinum* L, *Plant Physiol.*108, 1185-95.
- Fu J., Huang B, (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress, *Environ. Exp. Bot.* 45, 105–114.
- Fu J., Momčilović I., Clemente T.E., Nersesian N., Trick H.N., Ristic Z. (2008) Heterologous expression of a plastid EF-Tu reduces protein thermal aggregation and enhances CO₂ fixation in wheat (*Triticum aestivum*) following heat stress, *Plant Molecular Biology* 68, 277–288.
- Fulda S., Mikkat S., Stegmann H., Horn R. (2011) Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Plant Biology* 13, 632–642.
- Gallie D.R., Le H., Caldwell C., Tanguay R.L., Hoang N.X. Browning K.S. (1997) The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat, *J. Biol. Chem.* 272, 1046–1053.
- Gąsiorowski H. (2010) Jęczmień chemia i technologia, PWRL Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- Genard H., Le Saos J., Hillard J., Tremolieres A., Boucaud J. (1991) Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*, *Plant Physiol. Biochem.* 29, 421–427.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants, *Plant Signal Behav* 51, 26–33.
- Gill S.S., Tuteja, N. (2010a). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Giri J. (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants, *Plant Signaling & Behavior* 6, 1746-1751.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.ssp.japonica), *Science*, 296, 92-100.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, *Proteomics* 4, 3665-3685.

- Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress, *Biochem J.* 15, 151-7.
- Górny A., Ratajczak D. (2008) Efficiency of nitrogen and phosphorus utilization in progenies of factorial crosses between European and exotic cultivars of spring barley (*Hordeum vulgare* L.), *J Appl Genet* 49, 349–355.
- Górny A. (2001) Variation in utilization efficiency and tolerance to reduced water and nitrogen supply among wild and cultivated barleys, *Euphytica* 117, 59–66.
- Grace S.C., Logan B.A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 1499–1510.
- Grandbastien M.A. (2014) LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response, *Biochim Biophys Acta.* 184 doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.017.
- Guo P., Baum M., Grando S., Ceccarelli S., Bai G., Li R., Korff M., Varshney R.K., Graner A., Valkoun J. (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage, *Journal of Experimental Botany* 60, 3531–3544.
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K., Chowdhuri D.K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 13, 86, 377-84.
- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S., Salekdeh G. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress, *Proteomics* 5, 950–960.
- Hamilton E.W., Heckathorn S.A. (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine, *Plant Physiol.*, 126, 1266–1274.
- Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y. (2011) Plant dehydrins and stress tolerance, *Plant Signaling & Behavior* 6, 1503-1509.
- Hanson A.D., May A.M., Grumet R., Bode J., Jamieson G.C., Rhodes D. (1985) Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts, *Proc Natl Acad Sci* 82, 3678-82.
- Hanson A.D., Nelsen C.E., Everson E.H. (1977) Evaluation of Free Proline Accumulation as an Index of Drought Resistance Using Two Contrasting Barley Cultivars, *Crop Sci.* 720–726.
- Hanson J., Smeekens S. (2009) Sugar perception and signaling—an update, *Curr Opin Plant Biol* 12, 562–567.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. (2005) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu, *J Plant Physiol.* 158, 1333–1339.
- Hartl H. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature.* 13, 381, 571-9.

- Hellmann H., Funck D., Rentsch D., Frommer W.B. (2000) Hypersensitivity of an Arabidopsis Sugar Signaling Mutant toward Exogenous Proline Application, *Plant Physiol.* 123, 779–789.
- Helmy M., Tomita M., Ishihama Y. (2011) OryzaPG-DB: Rice Proteome Database based on Shotgun Proteogenomics, *BMC Plant Biol.* 11, 44-63.
- Henzel W.J., Watanabe C. (2003) Protein Identification: The Origins of Peptide Mass Fingerprinting, *J Am Soc. Mass Spectrom* 14, 931–942.
- Hjærnø K. (2007) Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting. In: *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*, ed. Matthiesen R., Humana Press Inc., Totowa, NJ:61-74.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hu C.A., Delauney A.J., Verma D.P. (1992) A bifunctional enzyme (δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9354–9358.
- Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y., Yu J., Chen Z. (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress, *Plant Physiol* 153,1526–1538.
- Huang D., Wu W., Abrams S.R., Cutler A.J. (2008) The relationship of drought-related gene expression in Arabidopsis thaliana to hormonal and environmental factors, *J. Exp. Bot.* 59, 2991–3007.
- Hummel J., Niemann M., Wienkoop S., Schulze W., Steinhauser D., Selbig J., Walther D., Weckwerth, W. (2007) PROMEX: a mass spectral reference database for proteins and protein phosphorylation sites, *BMC Bioinformatics* 8, 216.
- Hundertmark M., Hinch D.K (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana, *BMC Genomics* 9, 118.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis, *Plant Physiol* 81, 802-6.
- Hurkman W.J., Thanaka C.K. (1987) The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots, *Plant Physiol.* 83, 517-524.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1996) Effect of Salt Stress on Germin Gene Expression in Barley Roots, *Plant Physiol.* 110, 971-977.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (2007) High-Resolution Two-Dimensional Gel Electrophoresis: A Cornerstone of Plant Proteomics, w: *Plant Proteomics*, Samaj J., Thelen J.J., Springer-Verlag, Berlin, 17-24.

- International Tomato Genome Sequencing Project ;
<http://solgenomics.net/organism/solanum_lycopersicum/genome>.
- Isokpehi R.D., Simmons S.S., Cohly H.H.P., Ekunwe B., Ayensu W.K. (2011) Identification of Drought-Responsive Universal Stress Proteins in Viridiplantae, *Bioinform Biol Insights*, 5, 41–58.
- Jain D., Chattopadhyay D. (2010) Analysis of gene expression in response to water deficit of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties differing in drought tolerance, *BMC Plant Biol* 10, 24.
- Jiang C., Xu J., Zhang H., Zhang X., Shi J., Li M., Ming F. (2009) A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.* 32, 1046-59.
- Jimenez A., Hernandez J.A., Del Rio L.A., Sevilla F. (1997) Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves, *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Jones H.G., Jones M.B. (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms, in: H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (Eds.), *Plants, Under Stress*, Cambridge university Press, Cambridge, 1989, 1–10.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio A.F, Altabella T., Galston A.W. (2003) Polyamines in plants: an overview, *J Cell Mol Biol* 2, 1–12.
- Kausar R., Arshad M., Shahzad A., Komatsu S. (2013) Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress, *Amino Acids*, 44, 345-59.
- Kavar T., Maras M., Kidric M., Sustar-Vozlic J., Meglic V. (2007) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress, *Mol. Breed.* 21, 159–172.
- Ke Y., Han G., He H., Li J. (2009) Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress, *Biochem Biophys Res Commun* 379, 133–138.
- Kelleher N.L., Lin H.Y., Valaskovic G.A., Aaserud D.J., Fridriksson E.K., McLafferty F.W. (1999) Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 806-812.
- Kersey P.J., Allen J.E., Christensen M., Davis P., Falin L.J., Grabmueller C., Hughes D.S.T., Humphrey J., Kerhornou A., Khobova J. (2014) Ensembl Genomes 2013: scaling up access to genome-wide data, *Nucleic Acids Res.* 42, 546–552.
- Kim S.H., Kim S.H., Palaniyandi S.A., Yang S.H. , Suh J.W. (2015) Expression of potato S-adenosyl-L-methionine synthase (SbSAMS) gene altered developmental characteristics

and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants, *Plant Physiology and Biochemistry* 87, 84-91.

Kishor P.B, Hong Z., Miao G.C., Hu C.A.A., Verma D.P.S. (1995) Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants, *Plant Physiol* 108, 1387–1394.

Knochenmuss R., O'Connor P., Hossain M., Limbach P.A., Brunelle A., Laprevote O. (2010) *Fundamentals of MALDI, W: Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, Cole R.B., Wiley, 2 edition.

Koornneef M., Leon-Kloosterziel K.M., Schwartz S.H., Zeevaart J.A.D. (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.* 36, 83–89.

Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Doring P., Vierling E. (2007) Complexity of the heat stress response in plants, *Curr Opin Plant Biol.* 10, 310-6.

Kovacs D., Agoston B., Tompa P. (2008) Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones, *Plant Signal Behav* 3, 710-713.

Lafitte H.R. Yongsheng G., Yan, S., Li Z.K. (2007) Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice, *J. Exp. Bot* 58, 169-175.

Lane B.G. (2000) Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins, *Biochem J* 349, 309-321.

Larcher, W. (2003) *Plants under stress, W: Physiological Plant Ecology, Ecophysiology and stress physiology of functional groups*, Larcher W. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 348-360.

Lee B.R., Kim K.Y., Jung W.J., Avice J.C., Ourry A., Kim, T.H. (2007). Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.), *J. Exp. Bot.* 58, 1271–1279.

Lee D.G., Ahsan N., Lee S.H., Bahk J.D., Kang K.Y., Lee B.H. (2009) Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots, *Journal of Plant Physiology* 166, 1—11.

Lee G.J., Vierling E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein, *Plant Physiol.* 122, 189–198.

Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. (2004) STAND, a Class of P-Loop NTPases Including Animal and Plant Regulators of Programmed Cell Death: Multiple, Complex Domain Architectures, Unusual Phyletic Patterns, and Evolution by Horizontal Gene Transfer, *J. Mol. Biol.* 343, 1–28.

Leung J., Giraudat J. (1998) Abscisic acid signal transduction, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 199–222.

- Li W.T., Wei Y.M., Wang J.R., Liu C.J., Lan X.J., Jiang Q.T., Pu Z.E., Zheng Y.L. (2010) Identification, localization, and characterization of putative USP genes in barley), *Theor Appl Genet* 121, 907–917.
- Liebler D., Yates J.R., (2002) High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, O'Farrell P.H., *The Journal of Biological Chemistry, Introduction to Proteomics, Tools for the New Biology*. Humana Press Inc., New Jersey, 1-15
- Lilley K.S., Razzaq A., Dupree P. (2002) Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation, *Curr Opin Chem Biol.* 6, 46-50.
- Lin C.Y., Chen Y.M., Key J.L (1985) Solute leakage in soyabean seedlings under various heat shock regimes, *Plant Cell Physiol*, 26, 1493–1498.
- Lin K.H., Pu S.F. (2010) Tissue- and genotype-specific ascorbate peroxidase expression in sweet potato in response to salt stress, *Biol Plantarum* 54, 664-670.
- Liotenberg S., North H., Marion-Poll A. (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants, *Plant Physiol. Biochem.* 37, 341–350.
- Lopez C.G., Banowetz G.M., Peterson C.J., Kronstad W.E. (2003) Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars, *Crop Sci* 43, 577–582.
- Luo Y., Liu Y.B., Dong Y.X., Gao X.Q., Zhang X.S. (2009) Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment, *J Plant Physiol.* 166, 385-94.
- Łukowska M., Józefaciuk G. (2013) Unknown Mechanism of Plants Response to Drought: Low Soil Moisture and Osmotic Stresses Induce Severe Decrease in CEC and Increase in Acidity of Barley Roots, *J. Agric. Sci.* 5.
- Mahajan S, Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139–158.
- Malhotra J.D., Kaufman R.J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Degrad. Misfolded Glycoproteins Mov, Stem Cells Clin.* 18, 716–731.
- Maqbool A., Zahur M., Husnain T., Riazuddin S. (2009) GUSP1 and GUSP2, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins, *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 109-114.
- Matthiesen R., Mutenda K.E. (2007) Introduction to Proteomics, w: *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*, red. Matthiesen R., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1-4.
- Mayer K.F., Martis M., Hedley P.E., Simková H., Liu H., Morris J.A., Steuernage I.B., Taudien S., Roessner S., Gundlach H., Kubaláková M., Suchánková P., Murat F., Felder M., Nussbaumer T., Graner A., Salse J., Endo T., Sakai H., Tanaka T., Itoh T., Sato K.,

- Platzer M., Matsumoto T., Scholz U., Dolezel J., Waugh R., Stein N. (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics, *Plant Cell*. 23, 1249-63.
- Melchiorre M., Robert G., Trippi V., Racca R., Lascano H.R. (2009) Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state, *Plant Growth Regul*, 57, 57-68.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci*. 7, 405–410.
- Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schönfeld H.J., Vierling E., Bukau B. (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK, *J Biol Chem*. 15, 31033-42.
- Mohammadi P.P., Moieni A., Hiraga S., Komatsu S. (2012a). Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *J. Proteomics* 75, 1906–1923.
- Mohammadi P.P., Moieni A., Komatsu S (2012) Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress, *Amino Acids* 43, 2137-2152.
- Momcilovic I., Ristic Z. (2007) Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development, *J Plant Physiol* 164, 90–99.
- Monneveux P., Sánchez C., Beck D., Edmeades G.O. (2006) Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. *Crop Sci*. 46, 180-191.
- Nakashima K., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1997) A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* 12, 851-86.
- Nam M.H., Huh S.M., Park W.J., Cho K., Kim D.Y., Yoon I.S. (2012) Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice, *Proteome Sci*. 10. doi: 10.1186/1477-5956-10-25.
- Narita Y., Taguchi H., Nakamura T., Ueda A., Shi W., Takabe T. (2004) Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves, *Plant Sci*. 167, 1009–1016.
- Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K. (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses, *The Plant Journal*, 34, 137–148.
- Nayyar H., Walia D.P. (2003) Water Stress Induced Proline Accumulation in Contrasting Wheat Genotypes as Affected by Calcium and Abscisic Acid, *Biol. Plant*. 46, 275–279.

- Nevo E., Beiles A., Kaplan D., Starch N., ZOOhary D. (1986) Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum* (Poaceae) in Iran, *Plant Syst. Evol.* 153,141–164.
- Nick P. (2013) Microtubules, signalling and abiotic stress, *The Plant Journal* 75, 309–323.
- Noga M., Sucharski F. Identyfikacja białek wspomaganą fragmentacją W Proteomika i metabolomika, Kraj A., Dreabik A., Silbering J, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego 2010, 234-252.
- Nonami A. (1998) Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials, *J. Plant Res.* 111, 373–382.
- O'Connor P.B., Hillenkamp F. (2007) MALDI Mass Spectrometry Instrumentation, W: MALDI-MS A practical guide to instrumentation, methods and applications, Hillenkamp F., Peter-Katalinic J. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 83-104.
- O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem.* 25, 4007-4021.
- Oh S.J., Kim Y.S., Kwon C., Park H.K., Jeong J.S., Kim J.K. (2009) Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions, *Plant Physiol* 2, 191–200.
- Owtrim G. (2006) Survey and summary RNA helicases and abiotic stress, *Nucleic Acids Research* 34, 3220–3230.
- Park S.Y, Noh K.J, Yoo J.H, Yu J.W, Lee B.W, Kim J.G, Seo H.S, Paek N.C. (2006) Rapid upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to dehydration is a characteristic of drought-tolerant genotypes in barley, *J Plant Biol* 49, 455–462.
- Patakas A. (2012) Abiotic stress induced morphological and anatomical changes in plants, W: Abiotic stress responses in plants, Parvaiz A., Prasad M., Springer, London, 20-32.
- Patnaik D, Khurana P. (2001) Germins and germin like proteins: an overview, *Indian J Exp Biol.* 39, 191-200.
- Patterson S.D., Aebersold R.H. (2003) Proteomics: the first decade and beyond, *Nature Genetics*, 33, 311-323.
- Pellegrineschi A., Reynolds M., Pacheco M., Brito R.M., Almeraya R., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions, *Genome* 47, 493–500.
- Plaut Z. (2003) Plant exposure to water stress during specific growth stages. *Encyclopedia of Water Science*, Taylor & Francis, New York, 673–675.

- Prashanth S.R., Sadhasivam V., Parida A. (2008) Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance, *Transgenic Res.* 17, 281-291.
- Qin F., Kakimoto M., Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Tran L.S.P., (2007) Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. *Plant J* 50, 54–69.
- Qin F., Sakuma Y., Tran L.S., Maruyama K., Kidokoro S., Fujita Y., Umezwa T., Sawano Y., Miyazono K., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2008) *Arabidopsis DREB2A*-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression, *Plant Cell.* 20, 1693-707.
- Quarrie S.A., Gulli M., Calestani C., Steed A., Marmioli N. (1994) Location of a gene regulating drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of Wheat, *Theor Appl Genet*, 89, 794–800.
- Rao D., Momcilovic I., Kobayashi S., Callergari E. (2004) Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, *Eur J Biochem* 271, 3684–3692.
- Rasmusson A.G., Soole K.L., Elthon T.E. (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria, *Annu Rev Plant Biol.* 55, 23-39.
- Reddy A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.
- Rehman S., Harris P.J.C., Ashraf M. (2005) Stress environments and their impact on crop production. W: *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*, Ashraf, M., Harris, P.J.C., Haworth Press, New York, USA, 3–18.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C Siedow C,N. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and inter-organellar signaling, *Plant Physiol.* 147, 357-366.
- Rhodes D., Hanson A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357–384.
- Richards R.A., Rawson H.M., Johnson D.A. (1986) Glaucousness in wheat: its development, and effect on water-use efficiency, gas exchange and photosynthetic tissue temperatures, *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 465–473.
- Roberts M.R., Collinge D.B. (2002) 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress *Plant Mol Biol.* 50, 1031-9.
- Rodziewicz (2014) Analiza proteomiczna liści jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) – poszukiwanie potencjalnych biomarkerów odporności na suszę.

- Rodziewicz P., Swarcewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., and Stobiecki M. (2014) Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1–19.
- Roxas V.P. (2000) Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Seedlings that Overexpress Glutathione S-Transferase/Glutathione Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229–1234.
- Roxas V.P., Smith R.K., Allen E.R., Allen R.D. (1997) Overexpression of glutathione S-transferase glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology* 15, 988–991.
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J. (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2, 1131–1145.
- Samarah N.H. (2005) Effects of drought stress on growth and yield of barley, *Agron. Sustain. Dev.* 25, 145–149.
- Sanan-Mishra N., Pham X.H., Sopory S.K., Tuteja N. (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 509–514.
- Sanchez A.C., Subudhi P.K., Rosenow D.T., Nguyen H.T. (2002) Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench), *Plant Mol Biol* 48, 713–26.
- Saranga Y., Menz M., Jiang C.X., Wright R.J., Yakir D., Paterson A.H. (2001) Genomic dissection of genotype×environment interactions conferring adaptation of cotton to arid conditions, *Genome Res* 11, 1988–95.
- Sari-Gorla M., Krajewski P., Di Fonzo N., Villa M., Frova C. (1999) Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers II. Plant height and flowering, *Theor Appl Genet* 99, 289–95.
- Sato Y., Yokoya S. (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7, *Plant Cell Rep* 27, 329–334.
- Scharf K.D. (2007) Complexity of the heat stress response in plants, *Curr Opin Plant Biol* 10, 310–316.
- Scheler C., Lamer S., Pan Z., Li X.P., Salnikow J., Jungblut P. (1998) Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS), *Electrophoresis*, 19, 918-927.
- Schmutz H., Cannon S.B., Schlueter J. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature* 463, 178-183.
- Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C. (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics, *Science* 326, 1112-1115.

- Seidler J., Zinn N., Boehm M.E., Lehmann W.D. (2010) De novo sequencing of peptides by MS/MS, *Proteomics*. 10, 634-49.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray, *Plant J. Cell Mol. Biol.* 31, 279–292.
- Sharma R., Sahoo A., Devendran R., Jain M. (2014) Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in *Arabidopsis*, *PLoS One* 10.1371/journal.pone.0092900.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal Chem.* 68, 850-8.
- Shewry P.R., Fido R.J. (1996) Protein Extraction from Plant Tissues, w: Protein Purification Protocols, red, Doonan S., Humana Press, Totowa, NJ, 23-29.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Liu Q, Kasuaga M, Ichimura K, Mizoguchi T, Urao T, Miyata S, Nakashima K, Shinwari ZK, Abe H, Sakuma Y, Ito T, Seki M. (1999) Molecular responses to drought stress in plants: regulation of gene expression and signal transduction. W: Plant responses to environmental stress, Smallwood M.F., Calvert C.M., Bowles D.J. Oxford, Bios Scientific Publishers; 133–43.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozak K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and Tolerance, *Journal of Experimental Botany* 58, 221–227.
- Sicher R.C., Timlin D., Bailey B. (2012) Responses of growth and primary metabolism of water-stressed barley roots to rehydration. *J Plant Physiol* 169, 686–695.
- Sikorska K., Rodziewicz P. (2011). Apekty metodyczne badań proteomów roślinnych. (Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza), 163–192.
- Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U. (2009) Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought, *Plant Growth Regul.* 58, 107–117.
- Singla-Pareek S.L., Reddy M.K., Sopory S.K. (2003) Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14672–14677.
- Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi T., Dyer W.E., Ho T.H.D., Qu R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene, *Plant Science* 155, 1–9.

- Smith R. (2009) Two-dimensional electrophoresis: An overview, in: Two-dimensional Electrophoresis Protocol, ed. Sheehan D., Tyther R., Humana Press, c/o Springer, New York, 3-19.
- Sommerer N., Centeno D., Rossignol M. (2007) Peptide Mass Fingerprinting Identification of Proteins by MALDI-TOF W: Plant Proteomics: Methods and Protocols, Thiellement H., Zivy M., Damerval C., Méchin V., Humana Press Inc, Totowa, NJ, 219-234.
- Staszków A., Swarcewicz B. (2011) Metody analizy metabolitów roślinnych z wykorzystaniem spektrometrii mas (Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza), 164-193.
- Steinberg T.H. (2009) Protein gel staining methods: an introduction and overview, *Methods Enzymol.* 463, 541-63.
- Stone S.L. (2014) The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling, *Front Plant Sci.* 5, 135.
- Subba P., Kumar R., Gayali S., Shekhar S., Parveen S., Pandey A., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. (2013) Characterization of the nuclear proteome of a dehydration-sensitive cultivar of chickpea and comparative proteomic analysis with a tolerant cultivar, *Proteomics*. doi:10.1002/pmic.201200380
- Subbarao G.V., Johansen C., Slinkard A.E., Rao R.C.N. , Saxena N.P., Chauhan Y.S. (1995) Strategies and scope for improving drought resistance in grain legumes, *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 469–523.
- Subbarao G.V., Nam N.H., Chauhan Y.S., Johansen C. (2000) Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits, *J. Plant Physiol.* 157, 651–659.
- Sugimoto M., Takeda K. (2009) Proteomic Analysis of Specific Proteins in the Root of Salt-Tolerant Barley, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73, 2762-2765.
- Sule A., Vanrobaeys F., Hajos G., Van Meeumen J., Devreese B. (2004) Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots, 12, 1853-1863.
- Sun W., Van Motangu M., Verbruggen N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants, *Biochim Biophys Acta*, 19, 1–9.
- Syka J.E.P., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt, D.F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9528–9533.
- Szabados L., Savoure A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid, *Trends Plant Sci* 15, 89–97.

- Teulat B., Monneveux P., Wery J., Borriès C., Souyris I., Charrier A. (1997) Relationships between relative water content and growth parameters in barley: a QTL study. *New Phytol* 137, 99-107.
- Tezara W., Mitchell V.J., Driscoll S.D., Lawlor D.W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP, *Nature* 401, 914–917.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* 408, 796-815.
- The Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato, *Nature* 475, 189-195.
- Thiede B., Höhenwarter B., Kraha A., Mattow J., Schmid M., Schmid F., Jungblut P.R. (2005) Peptide mass Fingerprinting, *Methods* 35, 237–247.
- Timperio A.M., Egidi M.G., Zolla L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP), *J Proteomics* 71, 391–411.
- Tondelli A., Stanca M., Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E. (2010) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics, *Field Crops Research* 105, 1–14.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Tuberosa R., and Salvi S. (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops, *Trends Plant Sci.* 11, 405–412.
- Tunnacliffe A., Hinch D.K., Leprince O., Macherel D. (2010) LEA Proteins: Versatility of Form and Function, Dormancy and Resistance in Harsh Environments 21, 91-108.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson B., Bohmann J. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*, *Science* 313, 1596-1604.
- Valente M.A.S., Faria J., Soares-Ramos J.R.L., Reis P.A.B., Pinheiro G.L., Piovesan N.D., Morais A.T., Menezes C.C., Cano M.A.O., Fietto L.G., Loureiro M.E., Aragão F.J.L., Fontes E.P.B. (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco, *J Exp Bot.* 60, 533–546.
- Valente M.A.S., Faria J.A.Q.A., Soares-Ramos J.R.L., Reis P.A.B., Pinheiro G.L., Piovesan N.D., Morais A.T., Menezes C.C., Cano M.A.O., Fietto L.G. (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco, *J. Exp. Bot.* 60, 533–546.
- Van Wijk K. J. (2001) Challenges and prospects of plant proteomics, *Plant Physiology*, 126, 501-508.

- Vandekerckhove J., Bauw G., Puype M., Van Damme J., Van Montagu M. (1985) Protein-blotting on Polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel, *Eur. J. Biochem.* 152, 9-19.
- Vashisht A.A., Pradhan A., Tuteja R., Tuteja N. (2005) Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 44, 76–87.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35,753–759.
- Vierling E. (1991) The Roles of Heat Shock Proteins in Plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 579-620.
- Wahid A., Rasul E. (2005) Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit, W: Handbook of Photosynthesis, Pessaraki M. CRC, Florida, 479–497.
- Wang W., Tai F., Chen S. (2008) Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis, *J. Sep. Sci.* 31, 2032-2039.
- Wang Y., Ying Y., Chen J., Wang X.C. (2004) Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance, *Plant Sci.* 167, 671-677.
- Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Cui M., Fuchigami L. (2006) Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) overexpressing cAPX exhibits enhanced tolerance to UV-B and heat stress, *J. Appl. Horticult.* 8, 87-90.
- Wang G.P., Li F., Zhang J., Zhao M.R., Hui Z., Wang W. (2010). Over accumulation of glycine betaine enhances tolerance of the photosynthetic apparatus to drought and heat stress in wheat, *Photosynthetica* 48, 30–41.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9, 244–252.
- Waters E.R., Lee G.J., Vierling E. (1995) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants, *Journal of Experimental Botany*, 47, 325-338.
- Wendelboe-Nelson C., Morris P.C. (2012), Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties, *Proteomics* 12, 3374–3385.
- Westram A., Lloyd J.R., Roessner U., Riesmeier J.W., Kossmann J. (2002) Increases of 3-phosphoglyceric acid in potato plants through antisense reduction of cytoplasmic phosphoglycerate mutase impairs photosynthesis and growth, but does not increase starch contents, *Plant, Cell and Environment* 25, 1133-1143.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.-C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I. (1996) From Proteins to Proteomes: Large Scale

- Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis, *Nat Biotech* 14, 61–65.
- Wilkinson S, Davies W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants, *Plant Cell Environ.* 25, 195–210.
- Witzel K., Weidner A., Surabhi G.K., Börrner A., Mock H.P. (2009) Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity, *J Exp Bot* 60, 3545–3557.
- Wood A.J. (2005) Eco-physiological adaptations to limited water environments, in: *Plant abiotic stress*, ed. Jenks M., A., Hasegawa P.M., 1st ed. 2005 by Blackwell Publishing Ltd, 1-10.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T., Wu R. (1996) Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* 110, 249-257.
- Xu Y., Cheyang Z., Huang B. (2011) Heat Shock Proteins in Association with Heat Tolerance in Grasses, *International Journal of Proteomics*, doi.org/10.1155/2011/529648.
- Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses, *Plant J* 34, 137-148.
- Yang W.J., Rich P.J., Axtell J.D., Wood K.V., Bonham C.C., Ejeta G., Mickelbart M.V., Rhodes, D. (2003) Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. *Crop Sci.* 43, 162–169.
- Yang X., Liang Z., Wen X., Lu C. (2008). Genetic engineering of the biosynthesis of glycine betaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 66, 73–86.
- Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. (2009) Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 11, 49–79.
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V, Šuštar-Vozlič J. (2013) Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *J Proteomics.* 14, 254-72.
- Zang X., Komatsu S. (2007) A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice, *Phytochemistry* 68, 426–437.
- Zhao Z., Assmann S.A. (2011) The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*, *J Exp Bot*, 62, 5179-89.
- Zorb C., Schmitt S., Muhling K.H. (2010) Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions, *Proteomics* 10, 4441–4449.

9. SUPLEMENT

Tab. S1. Różnice w poziomie akumulacji białek pomiędzy genotypami rodzicielskimi (CamB1/CI – Maresi) w warunkach kontroli i suszy; **-1** – wyższy poziom akumulacji białka w Maresi, **0**- równy poziom akumulacji, **+1**- wyższy poziom akumulacji u CamB1/CI.

Numeracja na żelu	Białko	Proces biologiczny	Różnica w poziomie akumulacji pomiędzy CamB1/CI i Maresi w kontroli (CamB1/CI - Maresi)	Różnica w poziomie akumulacji pomiędzy CamB1/CI i Maresi w suszy (CamB1/CI - Maresi)	Różnica pomiędzy suszą i kontrolą w CamB1/CI (susza - kontrola)	Różnica pomiędzy suszą i kontrolą w Maresi (susza - kontrola)
1	Białko z rodziny 14-3-3	Inne	0	0	-1	0
2	Białko z rodziny 14-3-3	Inne	0	0	0	-1
3	Białko z rodziny 14-3-3 B	Inne	0	0	0	0
4	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	0	0	0	0
5	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	-1	-1	-1	0
6	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-6	Inne	0	0	0	0
7	Białko z rodziny 14-3-3 GF14-C	Inne	0	-1	0	1
8	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
9	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	1	-1	1	1
10	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
11	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0	-1	1	1
12	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
13	Białko szoku cieplnego 16.9 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
14	Białko szoku cieplnego 17.6 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
15	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	0	0	0	-1
16	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	-1	-1	1	1
17	Mutaza fosfoglicerynianowa zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu	Metabolizm węgla	0	0	0	0
18	Aldolaza 2-hydro-3-deoksyfosfoheptonowa	Metabolizm węgla	0	0	0	0
19	Proteasom 26S, podjednostka 4, homolog	Mechanizmy obronne	0	-1	-1	-1
20	Proteasom 26S, podjednostka 6A, homolog	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
21	Proteasom 26S niezależny od ATP	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
22	Proteasom 26S	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
23	Białko rybosomalne S8, fragment	Ekspresja genów	0	0	0	1
24	Białko rybosomalne 30S S4, mitochondrialne	Ekspresja genów	0	0	-1	0
25	Białko rybosomalne 40S S4	Ekspresja genów	0	0	0	0
26	Białko 60 kDa indukowane jasiononami	Mechanizmy obronne	0	0	-1	0
27	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
28	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
29	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
30	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	-1	-1
31	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	-1	0	0	0
32	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
33	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
34	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
35	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
36	Białko szoku cieplnego 80 kDa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
37	Abhydrolaza 3	Metabolizm węgla	1	0	-1	0
38	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	0
39	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	-1	-1	0	0
40	Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	0
41	Aktyna 1	Inne	0	0	0	-1
42	Aktyna 1	Inne	0	0	0	0
43	Fosforybulotransferaza adeninowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
44	Adenozylhomocysteina	Metabolizm azotu	0	0	0	0
45	Aldo-keto reduktaza	Metabolizm węgla	1	0	-1	0
46	Aminotransferaza	Metabolizm azotu	0	0	0	-1
47	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
48	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
49	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
50	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	-1	0	0
51	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	-1	0
52	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
53	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
54	Peroksydaza askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
55	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0	0	0	0
56	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	0	0	0	0
57	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0	0	0	0
58	Syntaza ATP, podjednostka beta	Transport elektronów	0	0	0	0
59	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0	0	0	0
60	Syntaza ATP, podjednostka beta, mitochondrialna	Transport elektronów	0	0	0	0
61	Syntaza ATP, podjednostka beta	Transport elektronów	0	0	0	-1
62	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
63	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	1	0	0	1
64	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	-1	-1	0	0
65	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	Mechanizmy obronne	0	0	1	1
66	1-3-beta galaktozylotransferaza	Metabolizm węgla	0	1	0	0
67	Beta-glukozydaza	Metabolizm węgla	0	0	0	0
68	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0	0	-1	0
69	O-metylotransferaza kwasu kawowego 1	Metabolizm wtórny	0	0	0	0
70	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0	0	0	0
71	O-metylotransferaza kwasu kawowego	Metabolizm wtórny	0	0	-1	-1
72	Syntaza kalozy	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
73	Chaperon	Mechanizmy obronne	0	-1	0	1
74	Białko szoku cieplnego 60 kDa, mitochondrialne	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
75	Białko obronne indukowane chityną aktywujące gibereliny	Mechanizmy obronne	-1	0	1	0

76	Chitynaza, prekursor	Metabolizm węgla	0	0	0	0
77	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, protoplastowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
78	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
79	Białko późnej embriogenezy	Mechanizmy obronne	0	0	1	1
80	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	1	1	1	1
81	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0	0	1	1
82	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0	0	1	1
83	Białko regulowane stresem chłodu	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
84	Profitepsyna	Inne	0	0	0	0
85	Syntaza cysteinowa, prekursor	Metabolizm azotu	-1	0	0	-1
86	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	0	0	0	-1
87	Syntaza cysteinowa, prekursor	Metabolizm azotu	1	1	0	0
88	Zależna od ATP helikaza RNA z motywem DEAD-box	Ekspresja genów	0	0	0	0
89	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
90	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
91	Reduktaza dehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
92	Białko z rodziny hydrolaz laktonowych	Metabolizm węgla	0	0	0	0
93	Białko należące do kompleksu replikacyjnego GINS	Ekspresja genów	-1	-1	0	0
94	Białko należące do kompleksu replikacyjnego GINS	Ekspresja genów	0	0	0	1
95	Zależna od DNA polimeraza RNA II, duża podjednostka	Ekspresja genów	0	0	0	0
96	Zależna od DNA polimeraza RNA II, duża podjednostka	Ekspresja genów	0	0	0	0
97	Ligaza ubikwityny E3	Ekspresja genów	-1	0	0	0
98	Czynnik elongacyjny Tu, mitochondrialny	Ekspresja genów	0	0	0	0
99	Czynnik elongacyjny Tu, mitochondrialny	Ekspresja genów	0	0	1	0
100	Enolaza	Metabolizm węgla	0	0	0	0
101	Enolaza	Metabolizm węgla	0	0	0	0
102	Esteraza	Metabolizm węgla	0	0	0	0
103	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	0	0	0	0
104	Białko z rodziny F-box	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
105	Białko z rodziny F-box	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
106	Dehydrogenaza mrończanowa, mitochondrialna	Inne	0	0	1	1
107	Białka z rodziny formin	Inne	0	-1	0	0
108	Fruktokinaza	Metabolizm węgla	0	-1	-1	-1
109	Fruktokinaza	Metabolizm węgla	0	0	-1	-1
110	Aldolaza fruktozo-bisfosforanu, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	0
111	Esteraza GDSL	Metabolizm węgla	0	0	0	0
112	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0	0	1	0
113	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
114	Germina 8-5	Mechanizmy obronne	0	1	0	-1
115	Ligaza glutaminianu amonowego 1-4, cytoplazmatyczna	Metabolizm azotu	0	0	0	0
116	Syntetaza glutaminowa GS2b	Metabolizm azotu	0	0	0	0
117	Syntetaza glutaminowa GS2b	Metabolizm azotu	0	0	0	0
118	Syntetaza glutaminowa GS2b, plastydowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
119	Syntetaza glutaminowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
120	Syntetaza glutaminowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
121	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0	0	1	1
122	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
123	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	-1	0	0	0
124	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
125	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0	-1	-1	0
126	Transferaza S-glutationowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
127	Białko wiążące nukleotydy guaninowe	Ekspresja genów	0	0	0	0
128	ATP-aza, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	-1	-1	1	1
129	ATP-aza, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport elektronów	-1	-1	0	0
130	Białko szoku cieplnego	Mechanizmy obronne	0	0	0	-1
131	Białko szoku cieplnego	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
132	Białko kompleksu CRS1	Ekspresja genów	0	0	0	0
133	Białko kompleksu CRS1	Ekspresja genów	-1	0	1	0
134	Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP	Metabolizm węgla	0	0	0	0
135	Reduktaza izoflawonowa	Metabolizm wtórny	0	0	0	0
136	Izomeraza izopentyldifosforanowa	Metabolizm wtórny	0	0	0	0
137	Reduktoizomeraza ketolokwasowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
138	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0	-1	0	0
139	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0	0	-1	0
140	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
141	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
142	Peroksydaza L-askorbinianowa 2, cytozolowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
143	Peroksydaza L-askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
144	Peroksydaza L-askorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	0	-1	-1
145	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0	-1	0	-1
146	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	1
147	Lipoksygenaza	Metabolizm węgla	0	0	0	0
148	Aldolaza L-treoninowa 1	Metabolizm azotu	0	0	0	1
149	Białko wiążące światło ER 2	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
150	Dehydrogenaza jablczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	-1	-1	0
151	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0	0	0	-1
152	Kinaza aktywowana mitogenami 6	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
153	Kinaza aktywowana mitogenami 15	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
154	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
155	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
156	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, peroksyzomy	Mechanizmy obronne	0	1	-1	-1
157	Reduktaza monodehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	0	-1	0	0
158	Reduktaza monodehydroaskorbinianowa	Mechanizmy obronne	-1	-1	0	0
159	Dehydrogenaza semialdehydu aminoadypinowego zależna od NAD	Metabolizm węgla	0	-1	0	0
160	Dehydrogenaza jablczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	-1	1	1
161	Dehydrogenaza jablczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	-1	0	0
162	Dehydrogenaza jablczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	1	-1	1	1
163	Reduktaza mononukleotydu flavinowego zależna od NADP	Transport elektronów	1	0	0	1
164	Kinazy receptorowe PRG-1 z motywem NBS-LRR	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
165	Kinaza difosfonukleozydowa 1	Transport elektronów	0	0	0	0
166	Fosfodiesteraza	Inne	0	0	0	0
167	Oksydaza szczawianowa 1	Mechanizmy obronne	0	0	1	0
168	Białko z rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop	Inne	-1	-1	1	1
169	Białko z rodziny hydrolaz trifosfonukleotydów zawierających motyw P-loop	Inne	0	0	0	0
170	Dehydrogenaza delta-1-pirilino-5-karboksyłanu	Mechanizmy obronne	-1	0	0	0

171	Dehydrogenaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu 12A1, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	0	0	0	1
172	Amoniakoliza feniloalaniny	Metabolizm wtórny	0	-1	-1	0
173	Liaza laktoglutationowa	Mechanizmy obronne	0	1	1	0
174	Amoniakoliza feniloalaniny	Metabolizm wtórny	0	0	-1	-1
175	Amoniakoliza feniloalaniny	Metabolizm wtórny	0	0	-1	-1
176	Amoniakoliza feniloalaniny	Metabolizm wtórny	0	0	0	0
177	Peroksyredoksyna	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
178	Fosfoglukomutaza 1	Metabolizm węgla	-1	0	0	0
179	Fosfoglukomutaza 1	Metabolizm węgla	0	-1	0	0
180	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	0
181	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	-1	0	0
182	Mutaza fosfoglicerynianowa	Metabolizm węgla	-1	-1	0	0
183	Mutaza fosfoglicerynianowa, prekursor	Metabolizm węgla	-1	-1	0	1
184	Hydrataza fosfopirogronianowa	Metabolizm węgla	0	-1	0	0
185	Izomeraza disiarczkowa, prekursor	Inne	0	0	0	0
186	Izomeraza disiarczkowa	Inne	0	0	0	0
187	Białko PAIR1	Ekspresja genów			0	
188	Proteosom, podjednostka alfa (typ 2)	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
189	Proteosom, podjednostka alfa (typ 1)	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
190	Proteosom, podjednostka alfa (typ 1)	Mechanizmy obronne		0	1	
191	Dekarboksylaza pirogronianowa 1	Metabolizm węgla	0	0	0	0
192	Dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0	-1	0	1
193	Białko regulujące kondensację chromosomów	Ekspresja genów				
194	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	0	0	-1	-1
195	Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	1	0	-1	-1
196	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	-1	-1	0	0
197	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu		1	0	
198	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0	-1	0	0
199	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0	0	0	1
200	Dekarboksylaza S-adenozylometioninowa, proenzym	Metabolizm azotu	0	1	0	-1
201	Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	0	0	0	0
202	Białka szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne		-1	1	
203	Dehydrogenaza siałaldehydu bursztynowego, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0	-1	0	1
204	Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
205	Peroksydaza tioredoksynowa	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
206	Czynnik transkrypcyjny BIM1	Ekspresja genów	1	0	0	0
207	Transketolaza	Metabolizm węgla	-1	0	1	0
208	Transketolaza	Metabolizm węgla	-1	0	1	0
209	Czynnik inicjacji translacji 5A	Ekspresja genów	0	0	0	1
210	Czynnik inicjacji translacji	Ekspresja genów	0	0	-1	-1
211	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla				
212	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	-1
213	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	0
214	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla		0		
215	Izomeraza trifosforanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0	0	0	-1
216	Tubulina, podjednostka alfa	Inne	0	0	-1	0
217	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne		0	0	
218	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne	1	0	0	1
219	Uniwersalne białko stresu, izoforma 1	Mechanizmy obronne	0	0	0	0
220	Urydylotransferaza UTP-glukoza-1-fosforanu	Metabolizm węgla	0	0	0	0
221	Urydylotransferaza UTP-glukoza-1-fosforanu 1	Metabolizm węgla	0	0	0	0
222	Urydylotransferaza UTP-glukoza-1-fosforanu	Metabolizm węgla	0	0	0	0
223	V-typ ATPaza	Transport elektronów				0
224	V-typ ATPaza, podjednostka A	Transport elektronów			1	1
225	V-typ ATPaza	Transport elektronów	0	0	-1	0
226	V-typ ATPaza, podjednostka A	Transport elektronów	0	0	0	0
227	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	1	1	0	0
228	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	-1	-1	0	0
229	V-typ ATPaza, podjednostka B	Transport elektronów	0	0	0	0
230	V-typ ATPaza, podjednostka C	Transport elektronów			-1	
231	V-typ ATPaza	Transport elektronów	0	0	0	0
232	Niezidentyfikowane	Nieznana				
233	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
234	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	-1	0	0
235	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
236	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
237	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
238	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
239	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
240	Niezidentyfikowane	Nieznana		0		
241	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
242	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	0
243	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
244	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
245	Niezidentyfikowane	Nieznana		-1		0
246	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	0	-1	0
247	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
248	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
249	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
250	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
251	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
252	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	0
253	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
254	Niezidentyfikowane	Nieznana		0		
255	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	-1	0
256	Niezidentyfikowane	Nieznana				
257	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
258	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
259	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
260	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	1	-1	0
261	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	1	1	0
262	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
263	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
264	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
265	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
266	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
267	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	0
268	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	1
269	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
270	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	-1	-1

271	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	-1
272	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
273	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
274	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	1
275	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	-1	0	0
276	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	-1	-1
277	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
278	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	1
279	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
280	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
281	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
282	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
283	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	0	0	0
284	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	-1	0	0
285	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
286	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
287	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
288	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
289	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	1	
290	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
291	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
292	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
293	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
294	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	-1
295	Niezidentyfikowane	Nieznana		0		
296	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
297	Niezidentyfikowane	Nieznana		0		
298	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
299	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
300	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
301	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
302	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	0	0	0
303	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	1
304	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	-1	-1
305	Niezidentyfikowane	Nieznana				
306	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
307	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
308	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
309	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
310	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
311	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
312	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
313	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
314	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
315	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
316	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
317	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
318	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
319	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
320	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
321	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
322	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	1	
323	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	0
324	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	1
325	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
326	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
327	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
328	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
329	Niezidentyfikowane	Nieznana			0	
330	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
331	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
332	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
333	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
334	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
335	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	1
336	Niezidentyfikowane	Nieznana		-1		1
337	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	1
338	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	0	0	1
339	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
340	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	1
341	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	1	0	0
342	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
343	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	0
344	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
345	Niezidentyfikowane	Nieznana		-1		
346	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
347	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
348	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
349	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	1
350	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
351	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
352	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
353	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
354	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
355	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	1
356	Niezidentyfikowane	Nieznana	1	0	-1	0
357	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
358	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	-1	0	0
359	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
360	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
361	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
362	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
363	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
364	Niezidentyfikowane	Nieznana		0		

365	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
366	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
367	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
368	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	-1
369	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	1	1	0
370	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
371	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
372	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	1	0
373	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	1	0
374	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
375	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	1	0
376	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1	0	0	-1
377	Niezidentyfikowane	Nieznana		0	0	
378	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
379	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
380	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0
381	Niezidentyfikowane	Nieznana	0	0	0	0