

Preučevanje odziva na sušni stres pri metuljnicah (Fabaceae) s proteomiko

Tanja ZADRAŽNIK¹, Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ²

Received March 02, 2015; accepted March 16, 2015.

Delo je prispelo 02. marca 2015, sprejeto 16. marca 2015.

IZVLEČEK

Sušni stres predstavlja resno grožnjo pri pridelovanju kmetijskih rastlin, saj povzroča slabšo rast in razvoj rastlin ter posledično vpliva na količino in kakovost pridelka. Odziv rastlin na stres se kaže v spremembah metabolizma celice, ki med drugim vključuje spremenjeno izražanje proteinov. Učinkovito analizo proteinov, udeleženih pri odgovoru rastlin na stresne razmere, omogoča proteomika. Raziskave izražanja proteinov pri metuljnicah pri odzivu na sušo igrajo veliko vlogo, saj so metuljnice zelo pomembne v prehrani ljudi in živali ter tudi pogosto izpostavljene suši. Rezultati proteomskih raziskav pri izbranih metuljnicah omogočajo boljše razumevanje molekularnih mehanizmov odgovora rastlin na sušni stres, prispevajo k razvoju markerjev, povezanih z odgovorom rastlin na sušo ter so uporabni pri vzgoji novih, na sušo tolerantnih sort metuljnic.

Ključne besede: metuljnice, stres, suša, proteomika, proteini

ABSTRACT

PROTEOMIC STUDIES OF DROUGHT STRESS RESPONSE IN FABACEAE

Drought stress is a serious threat to crop production that influences plant growth and development and subsequently causes reduced quantity and quality of the yield. Plant stress induces changes in cell metabolism, which includes differential expression of proteins. Proteomics offer a powerful approach to analyse proteins involved in drought stress response of plants. Analyses of changes in protein abundance of legumes under drought stress are very important, as legumes play an important role in human and animal diet and are often exposed to drought. The presented results of proteomic studies of selected legumes enable better understanding of molecular mechanisms of drought stress response. The study of drought stress response of plants with proteomic approach may contribute to the development of potential drought-response markers and to the development of drought-tolerant cultivars of different legume crop species.

Key words: legumes, drought stress, proteomics, proteins

1 UVOD

Rastline so pogosto izpostavljene neugodnim vplivom iz okolja, ki vplivajo na njihovo rast, razvoj in pridelek. Poleg biotskega stresa, ki ga povzročajo bolezni in škodljivci, k zmanjšanju količine in kakovosti pridelka kmetijskih rastlin v veliki meri prispeva tudi abiotični stres. Med vrstami abiotičnega stresa je najbolj razširjen sušni stres, ki se pojavlja v povezavi z manjšo količino padavin, njihovo neenakomerno razporeditvijo in pogosto tudi s povišanimi temperaturami. Sušni

stres vpliva na pridelovanje kmetijsko pomembnih rastlinskih vrst, tudi na metuljnice.

Metuljnice po količini pridelka zavzemajo tretjo mesto svetovne pridelave kmetijskih rastlin (Popelka in sod., 2004). Vrste med njimi, kot so vrtni grah (*Pisum sativum* L.), bob (*Vicia faba* L.), fižol (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), leča (*Lens culinaris* Medik.), čičerika (*Cicer arietinum* L.) in arašidi (*Arachis hypogaea* L.) zavzemajo pomembno mesto v prehrani ljudi

¹ Dr., Oddelek za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje; Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana; E-mail: tanja.zadraznik@kis.si

² Izr. prof. dr., prav tam

po svetu, predvsem zaradi svoje visoke hranilne vrednosti, vsebnosti proteinov, dietnih vlaken in mineralov. Pomembne so tudi krmne metuljnice, kot sta soja in lucerna (*Medicago sativa* L.), ki predstavljajo bogat vir proteinov pri krmi živali. Soja pa je pomembna tudi za pridobivanje olja. V Sloveniji se največ pridelujeta fižol in grah, v manjši meri še soja, bob, leča in čičerika (Kocjan Ačko in sod., 2005). Po obsegu pridelovanja pa je fižol daleč najpomembnejša metuljnica v Sloveniji (Popis vrtnarstva, 2000).

Metuljnice so zelo pomembne tudi zaradi sposobnosti vezave dušika iz ozračja s pomočjo simbiotskih bakterij na koreninah (Muneer in sod., 2012). Po njihovem spravilu ostanejo v tleh rastlinski ostanki, ki so bogat vir dušika za posevke, ki jim sledijo. Najpomembnejše so simbiotske bakterije iz rodu *Rhizobium* in njemu sorodnih rodov, ki živijo v simbiozi z rastlinami in na njihovih koreninah tvorijo posebne gomoljčke - nodule, kjer poteka transformacija atmosferskega dušika v organsko obliko. Učinkovitost vezave dušika iz ozračja in sposobnost uporabe organske oblike dušika pri rastlini je v veliki meri odvisna od abiotičnih dejavnikov, med katerimi je tudi sušni stres.

Kombinacija sušnega stresa in visokih temperatur povzroča 18-28 % izgube pridelka zrnatih metuljnic (CGIAR Research program on grain legume, 2012). Po mnenju klimatologov bodo spremembe podnebja, ki jih bodo spremljale manjše količine padavin in povišane temperature, v prihodnje še bolj izrazite kot v zadnjih desetletjih (Kajfež-Bogataj, 2005). Z razvojem tolerantnih sort lahko prispevamo k prilagoditvi kmetijskih rastlin na podnebne spremembe, zato je toleranca na sušo postala cilj številnih žlahtniteljskih programov kmetijsko pomembnih rastlinskih vrst, med njimi tudi metuljnic (Miklas in sod., 2006). Za izbor in vzgojo sort, tolerantnih na sušo, je potrebno poznati fiziološke, morfološke in

biokemijske lastnosti, ki določene sorte opredeljujejo kot tolerantne (Bray, 1993). Toleranca na sušo je genetsko kompleksna lastnost, zato je za razvoj tolerantnih sort potrebno dobro poznavanje mehanizmov tolerance in odziva na sušni stres.

Pri odzivu rastlin na sušne razmere se sprožijo celično in tkivno specifični fiziološki in molekularni mehanizmi, ki vključujejo izražanje specifičnih genov in spremembe v vsebnosti določenih proteinov, ki igrajo pomembno vlogo med stresom (Ramachandra Reddy in sod., 2004). Razvoj novih metod je v zadnjem desetletju omogočil velik napredek pri identifikaciji genov in proteinov vključenih v odgovor na stres. Med t.i. metode »omike« uvrščamo poleg genomike, transkriptomike, metabolomike tudi proteomiko. Te metode omogočajo analizo kompleksnih celičnih procesov, medsebojnih vplivov med biološkimi komponentami in razumevanje kompleksnih procesov. Pristopi »omik« omogočajo sistemsko analizo in povezavo med spremembami v genomu, transkriptomu, proteomu, metabolomu z odzivi rastlin na sušni stres in omogočajo pridobitev podatkov/informacij, ki so pomembni za pridobivanje in razvoj sort tolerantnih na stres (Gupta in sod., 2013).

Proteomika obravnava celokupni nabor proteinov v celici, delu celice, tkivu ali organizmu, obsega pa metode, ki omogočajo določitev in identifikacijo velikega števila proteinov, prisotnih v določenih razmerah in v določenem času. Določeno število kodirajočih genov lahko določa veliko večje število proteinov, predvsem zaradi različnih posttranslacijskih sprememb. Proteom tako prikaže realno sliko aktivnosti v celici, saj so prav proteini nosilci funkcij v celici. V prispevku je podan pregled proteomskih raziskav odziva na sušo pri izbranih metuljnicah ter splošni vpogled v strategije preučevanja odziva na sušni stres pri rastlinah s tehnikami proteomike.

2 PROTEOMIKA IN SUŠNI STRES PRI METULJNICAH

Kljub hitremu napredku tehnik in metod s področja proteomike, so do sedaj identificirali samo majhen delež celičnega proteoma. To je uspelo samo pri najbolj preučevanih organizmih, kot so človek, vinska mušica (*Drosophila melanogaster* Meigen),

navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) in riž (*Oryza sativa* L.) (Jorrín-Novo in sod., 2009). Vendar celo pri naštetih organizmih ostaja funkcija velikega števila proteinov nepojasnjena. Določen protein ima lahko v

različnih tkivih in celo v isti celici povsem različno funkcijo. Funkcija proteinov je v določeni meri odvisna od lokalizacije proteinov znotraj celice in od njihove dejanske aktivnosti. Znotraj celice so proteini glede na njihove funkcije porazdeljeni neenakomerno, saj je število proteinov, ki so vključeni v uravnavanje celične homeostaze ter v presnovo in strukturo celice, mnogo večje, kot število tistih, ki sodelujejo v procesih signaliziranja. Zato sta določitev in kvantifikacija proteinov, ki v celicah niso prisotni v velikem številu, mnogo težji od določitve proteinov, katerih vsebnosti so večje (Zhang in sod., 2009; Corthals in Rose, 2007).

Objavljene so številne raziskave sušnega stresa na proteomski ravni pri različnih rastlinskih vrstah, kot so riž (Salekdeh in sod., 2002a in 2002b), sladkorna pesa (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Döll.) (Hajheidari in sod., 2005), koruza (*Zea mays* L.) (Vincent in sod., 2005), pšenica (*Triticum durum* Desf.) (Caruso in sod., 2009) ter druge. V nadaljevanju je predstavljen pregled odziva na sušni stres pri različnih metuljnicah na področju proteomike, kratek povzetek pa je podan v preglednici 1.

2.1 Proteomske analize odziva na sušni stres pri trnati meteljki

Med metuljnicami se je trnata meteljka (*Medicago truncatula* Gaertn.) uveljavila kot modelni organizem zlasti pri študijah simbiotskih interakcij med rastlino in mikrobi, kot tudi na drugih področjih rastlinske biologije (Lei in sod., 2007). Obsežno proteomsko študijo o analizi proteoma trnate meteljke v normalnih rastnih razmerah so opravili Watson in sod. (2003). Identificirali so proteine, ki so jih izolirali iz listov, stebel, korenin, semen, cvetov in celičnih suspenzij. Pri listih, steblih in cvetovih je bilo največje število proteinov povezanih z energijsko presnovo, pri suspenziji celic z energijsko presnovo in skladiščenjem, pri koreninah z obrambnimi procesi ter pri semenih s skladiščenjem. Larrainzar in sod. (2007) so preučevali vpliv simbiotskih interakcij med noduli trnate meteljke in bakterijami *Sinorhizobium meliloti* v povezavi s sušnim stresom. Ločena izolacija rastlinskih in bakterijskih proteinskih frakcij je omogočila neodvisno analizo odziva na stres obeh simbiotskih udeležencev. Največ proteinov, ki so jih identificirali v nodulih rastlin, je bilo udeleženih v presnovi aminokislin

ter pri sintezi ali razgradnji proteinov. Ugotovili so, da imajo pomembno vlogo tudi proteini, udeleženi pri obrambnih reakcijah proti stresu, v signalizaciji in pri procesih presnove. Izpostavili so protein saharoza sintazo, ki je vključen v odgovor na sušni stres. Poleg omenjene raziskave so Larrainzar in sod. (2009) objavili raziskavo o povezavi med presnovo ogljika in dušika v nodulih ter simbiotsko fiksacijo dušika pri rastlinah trnate meteljke v sušnem stresu. Na osnovi rezultatov predvidevajo, da je inhibicija simbiotske fiksacije dušika pri rastlinah v sušnem stresu povezana z oslabljenim metabolizmom bakterij in sposobnostjo fiksiranja N₂.

2.2 Proteomske analize odziva na sušni stres pri soji

Proteomske raziskave soje v sušnem stresu so delali tako na koreninah, kot tudi na nadzemnih zelenih delih. Yamaguchi in sod. (2010) so ugotovili, da so proteini, ki so jih identificirali na koreninah rastlin v sušnem stresu, v glavnem udeleženi v mehanizmu tolerance na sušni stres. Proteine so povezali z vlogo pri kontroli mehanizma reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), biosintezi izoflavonoidov, kontroli celične smrti in kontroli razgradnje proteinov. Proteomsko analizo korenin pri soji v sušnem stresu so opravili tudi Alam in sod. (2010). Prisotnost proteina feritina in dehidrina so zasledili samo pri vzorcih v sušnem stresu, čeprav so identificirali še 26 proteinov z različnimi celičnimi funkcijami, kot so presnova ogljikovih hidratov in dušika, transdukcija signalov, obramba celic in programirana celična smrt. Mohammadi in sod. (2012) so analizirali spremembe pri mladih kalečih rastlinah soje podvrženih suši ali osmotskemu stresu, vzpostavljenim s polietilen glikolom. Analizirali so proteine iz listov, hipokotila in korenin. Korenine so bile izmed vseh treh analiziranih tkiv organ z največjim številom proteinov, katerih izražanje se je spremenilo v stresnih razmerah. Pri listih so se v stresnih razmerah povečale vsebnosti proteinov, povezanih z energijsko presnovo, vsebnost proteinov, povezanih s sintezo proteinov pa se je zmanjšala. Ugotovili so, da se je v vseh treh organih rastlin v sušnem stresu zmanjšala vsebnost metionin sintaze. Na tej osnovi ter na osnovi rezultatov izražanja mRNA pri rastlinah v stresu zaradi suše, slanosti in vročine so sklepali, da je izražanje metionin sintaze povezano z odzivom na sušo. Podobno so tudi Nouri in Komatsu (2010) za

analizo proteinov plazmaleme uporabili mlade kaleče rastline soje v osmotskem stresu induciranim s polietilen glikolom. Poseben poudarek so avtorji namenili proteinu kalneksinu, ki se v osmotskem stresu nalaga v plazmalemi in proteinu H⁺-ATPazi. Pri obeh proteinih so opazili povečano izražanje v stresnih razmerah. Hossain in sod. (2013) so objavili obsežen pregled proteomskih raziskav abiotskega stresa pri soji. Podali so prednosti in slabosti različnih proteomskih metodoloških pristopov pri ekstrakciji celotnega proteoma. Opredelili so tudi cilje prihodnjih raziskav proteoma soje na ravni posameznih rastlinskih tkiv oz. celotnih rastlin z namenom, da bi dobili boljši vpogled v mehanizem odziva soje na abiotski stres. Ugotovili so, da bi bilo potrebno nameniti več pozornosti preučevanju interakcij protein-protein in protein-ligand ter interdisciplinarnim raziskavam, zlasti v povezavi z metabolomiko, da bi lahko preučili mrežo interakcij med proteini in metaboliti, ki so udeleženi v mehanizmu tolerance na abiotski stres. Avtorji so še izpostavili pomembnost preučevanja proteomov posameznih organelov, kar bi pripomoglo do boljšega razumevanja molekularnih mehanizmov celice pri odzivu na neugodne okoljske razmere. Preučevanje odziva soje na različne stresne dejavnike bi bilo zelo zanimivo za nadaljnje proteomske raziskave, saj bi tako dobili globlji in natančnejši vpogled v povezavo signalnih poti ob delovanju različnih abiotskih stresnih dejavnikov.

2.3 Proteomske analize odziva na sušni stres pri čičeriki

Pandey in sod. (2008) so analizirali jedrni proteom čičerike v povezavi s sušo. Med proteini, ki so jih določili, jih je največ vpletenih v gensko transkripcijo in replikacijo, celično signaliziranje ter remodeliranje kromatina. Bhushan in sod. (2007 in 2011) so opravili dve raziskavi o izražanju proteinov pri čičeriki v sušnih razmerah. V prvi so analizirali proteine, ki se različno izražajo v zunajceličnem matriksu rastlin v suši (Bhushan in sod., 2007). Identificirali so 134 proteinov, ki so v glavnem udeleženi v transdukciji signala, modifikacijah celične stene, energijsko presnovo ter celični obrambi. Sklepali so tudi na morebitno vlogo obravnavanih proteinov v toleranci na dehidracijo. V nadaljevanju so analizirali proteom zunajceličnega matriksa

čičerike v sušnem stresu pri sorti, občutljivi na sušo, in sorti tolerantni na sušo (Bhushan in sod., 2011). Ugotovili so, da je različno izražanje določenih proteinov odvisno od obravnavanega genotipa. Raziskave jedrnega proteoma čičerike v sušnem stresu so nedavno opravili tudi Subba in sod. (2013). Pri sorti občutljivi na sušo so identificirali 75 proteinov z različno vsebnostjo v suši, ki so jih povezali z različnimi presnovnimi in regulatornimi potmi v celici. Nato so proteom občutljive sorte primerjali s tolerantno sorto, iz česar so sklepali, da je toleranca lahko povezana s spremenjenim izražanjem številnih strukturnih proteinov ter proteinov, ki so povezani s prilagoditvijo na stres, kot so encimi povezani s katabolizmom reaktivnih kisikovih spojin. Najnovejša študija, ki so jo objavili Jaiswal in sod. (2014), obravnava proteomsko analizo membranskih proteinov čičerike v sušnem stresu. Izpostavili so Sad1/UNC-84 protein (CaSUN1), za katerega predvidevajo, da ima pri odzivu na stres vlogo pri signalizaciji odziva na nezvite proteine.

2.4 Proteomske analize odziva na sušni stres pri arašidih

Kottapalli in sod. (2009) so preučevali tri različne genotipe arašidov v sušnem stresu. S proteomsko analizo listov so identificirali proteine, ki so jih glede na funkcije razvrstili v deset skupin. Ugotovili so, da so največje skupine proteinov povezane s fotosintezo, transdukcijo signala in sušnega stresa. Predvidevajo, da so proteini, ki sodelujejo pri ojačanju celične stene, transdukciji signala, energijski presnovi, detoksifikaciji celic in genski regulaciji, udeleženi pri mehanizmu tolerance na sušo pri arašidih. Novejša študija, ki so jo opravili Kottapalli in sod. (2013), pa se osredotoča na proteomsko analizo semen arašidov izpostavljenih suši. Identificirali so 93 proteinov, ki so se različno izražali v suši. Ugotovili so, da ima suša največji vpliv na proteine, udeležene pri glikolizi, presnovi saharoze in škroba ter presnovi maščobnih kislin.

2.5 Proteomske analize odziva na sušni stres pri grahu

Taylor in sod. (2005) so preučevali različne vplive stresa, kot so suša, zmrzal in stres zaradi vpliva herbicidov, na proteom mitohondrijev v listih graha. Mitohondriji predstavljajo ključno mesto pri oksidativnem stresu in celičnem odgovoru na

stresne dejavnike. Ugotovili so, da je prisotnost herbicidov povzročila največji oksidativni stres v mitohondrijih, medtem ko sta zmrzal in suša povzročila stres v milejši obliki. Identificirane proteine so razvrstili v skupine glicin dekarboksilaz in serin hidroksimetiltransferaz, proteine vključene v cikel trikarboksilnih kislin in oksidativno fosforilacijo ter proteine vročinskega šoka. Spremembe v vsebnosti proteinov v nodulih pri grahu v sušnem stresu so preučevali Irar in sod. (2014). Identificirali so 18 proteinov, nekatere med njimi so razvrstili v skupino presnovno flavonoidov, presnovno žvepla in proteine, ki se vežejo na RNA.

2.6 Proteomske analize odziva na sušni stres pri lucerni

Odziv na sušni stres s proteomsko analizo pri lucerni so proučevali Aranjuelo in sod. (2011). Z namenom, da bi preučili odziv fotosintetskega aparata na sušni stres, so analizirali proteom listov. Poleg proteomske analize so opravili meritve fizioloških parametrov za določanje fotosintetske aktivnosti, pa tudi meritve nitrogenazne aktivnosti koreninskih gomoljčkov in analize vsebnosti aminokislin in sladkorjev v listih. Ugotovili so, da je inhibicija fotosinteze povezana z inhibicijo proteina Rubisco. V listih so zasledili zmanjšanje vsebnosti določenih aminokislin, kot sta asparagin in glutaminska kislina ter zmanjšanje vsebnosti proteina Rubisca, kar so povezali z manjšo vsebnostjo dušika, ki je bila posledica zmanjšane nitrogenazne aktivnosti. Sušni stres je vplival tudi na zmanjšanje vsebnosti proteina, ki se veže na Rubisco ter na povečanje izražanja proteaz, ki lahko vplivajo na razgradnjo proteina Rubisco. Zasledili so povečanje aminokislina prolina ter sladkorja pinitola, ki sta udeležena pri osmotski prilagoditvi na sušni stres.

2.7 Proteomika in odziv na sušni stres pri fižolu

V koreninah mungo fižola (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), izpostavljenega različnim stopnjam sušnega stresa, so s proteomskim pristopom identificirali proteine, ki sodelujejo pri detoksifikaciji ROS, presnovi žvepla, morfogenezi korenin, sintezi proteinov, v energijski presnovi in v celičnem signaliziranju (Sengupta in sod., 2011; Sengupta in Reddy, 2011). Na začetni stopnji sušnega stresa so zaznali zmanjšane vsebnosti proteinov povezanih s citoskeletom, vendar se je njihova vsebnost povečala pri daljši

izpostavljenosti stresu. Pri glikoproteinih, kot so lektini, pa so povečano vsebnost zaznali tako pri kratkotrajni kot tudi pri daljši izpostavljenosti stresu, kar nakazuje na pomembno vlogo lektinov pri odzivu na sušo pri metuljnicah. Avtorji predvidevajo, da je povečana vsebnost lektinov povezana z njihovo vlogo pri znotrajcelični regulaciji in poteh signalizacije, kar pripomore k prilagoditvi rastline na sušni stres. V stresu so opazili tudi povečano vsebnost proteinov, povezanih z oksidativnim stresom, kot so Cu/Zn superoksid dismutaza, oksidoreduktaza in aldehyd reduktaza (Sengupta in sod., 2011). Yang in sod. (2013) so opravili proteomsko analizo in analizo fosforilacije proteinov (fosfoproteomska analiza) koreninskih vršičkov navadnega fižola v osmotskem stresu induciranim s polietilen glikolom. Pri analizi celokupnih proteinov se je 22 proteinov različno izražalo v razmerah osmotskega stresa, kjer je bilo največ identificiranih proteinov udeleženih v presnovi glikovih hidratov in aminokislin. Analiza apoplastnih proteinov je pokazala, da je pri petih proteinih prišlo do zmanjšanja vsebnosti pri osmotskem stresu, pri sedmih proteinih pa do povečanja vsebnosti. Pri analizi celokupnih fosfoproteinov so izpostavili protein dehidrin, za katerega predvidevajo, da ima zaščitno vlogo pri osmotskem stresu preko zagotavljanja zaščitne vloge celične stene proti poškodbam in vzdrževanju integritete celične stene.

Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo analizirali odziv na sušo na ravni celokupnih proteinov v listih navadnega fižola pri dveh sortah, 'Tiber' in 'Starozagorski črn', ki se razlikujeta v toleranci na sušni stres (Zadražnik in sod., 2013). Ugotovili smo, da suša najbolj negativno vpliva na vsebnosti proteinov, ki so ključni za fotosintezo, kot so Rubisco, karbonska anhidraza, proteinov vključenih v fotolizo vode ter druge. Pri teh proteinih smo tudi zaznali najbolj izrazite razlike v vsebnosti med tema sortama. Pri sorti 'Starozagorski črn', ki je na sušo bolj občutljiva, se je vsebnost vseh proteinov tega tipa zmanjšala, pri sorti 'Tiber' pa se je vsebnost nekaterih proteinov, kot sta karbonska anhidraza in Rubisco, zmanjšala, pri drugih, kot so proteini vključeni v fotolizo vode, pa povečala. Ugotovili smo tudi, da suša vpliva na vsebnost proteinov, ki so povezani z energijsko presnovo, odzivom na stres, sintezo, proteolizo in zvižanjem proteinov. Na podlagi

rezultatov sklepamo, da lahko določene proteine uporabimo kot markerje v selekcijskem procesu tolerance na sušo pri navadnem fižolu. Za ta

namen bi bili najbolj primerni proteini, katerih vsebnost se med sortama razlikuje, to bi bili predvsem proteini vključeni v fotalizo vode.

3 STRATEGIJE PREUČEVANJA SUŠNEGA STRESA S PROTEOMIKO

Proteomske analize odziva na sušni stres so tako pri metuljnicah kot tudi pri ostalih rastlinah usmerjene k primerjalnim analizam vsebnosti proteinov med rastlinami v stresu in kontrolnimi rastlinami, v nekaterih primerih pa vključujejo še proteomsko primerjalno analizo tolerantnih in občutljivih sort na stres (Barkla in sod. 2013). Določitev razlik v vsebnosti proteinov med različnimi vzorci je dokaj zahtevna zaradi velike kompleksnosti proteoma in zahtevne analitike, povezane s preučevanjem proteinov. Rezultati proteomskih analiz v večini primerov ne nudijo celostnega vpogleda odziva rastline na stres na nivoju proteoma (Kosova in sod., 2011). Pri večini predstavljenih raziskav so identificirali samo proteine, kjer so bile vsebnosti največje; pri tem gre večinoma za hidrofilne, nemembranske proteine. Rezultati primerjalnih proteomskih analiz so v veliki meri odvisni od uporabljenih metod.

V proteomiki se največ uporablja metoda dvo-dimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze (2D-PAGE). Dobra stran 2D-PAGE je, da se lepo opazijo proteinske izo-oblike in razgradnja proteinov. Uporaba 2D-PAGE pa ima tudi nekaj pomanjkljivosti, ki so povezane s slabo ponovljivostjo izvedbe gelske elektroforeze in problemi pri kvantifikaciji proteinov iz gelov. Za zanesljivo kvantifikacijo je zato potrebno narediti več ponovitev istega vzorca. Za 2D-PAGE se je uveljavilo splošno mnenje, da je identifikacijski proces neobčutljiv in zahteven ter je v veliki meri odvisen od barvanja proteinov ter ostalih tehnik vizualizacije (Weckwerth, 2008). K delni rešitvi teh problemov je pripomogla uvedba diferencialne gelske elektroforeze (DIGE), ki temelji na uporabi fluorescentnih barvil (Timms in Cramer, 2008). Vse bolj se uveljavljajo tudi metode, ki ne temeljijo na uporabi gelov, temveč na ločitvi peptidov oz. proteinov s tekočinsko kromatografijo

(LC), ki je sklopljena z masno spektrometrijo (LC/MS) (Swanson in Washburn, 2005). Prednost metod proteomike, ki temeljijo na LC/MS, je možnost analize proteinov v zelo majhnih količinah ter analize hidrofobnih proteinov, kot so membranski proteini (Barkla in sod., 2013).

Raziskave sušnega stresa pri metuljnicah ter ostalih rastlinah se v zadnjem času vse bolj usmerjajo k analizam posameznim celičnim organelom določenih rastlinskih tkiv, ki v glavnem vključujejo analizo proteinov plazemske membrane, apoplasta, tonoplasta, kloroplastov, mitohondrijev ter jeder. Proteomska analiza specifičnih celičnih lokacij in organelov oz. subproteomika je dokaj zahtevna, zaradi težke izolacije subproteomov in njihove kompleksnosti (Barkla in sod., 2013). Poglobljeno znanje in identifikacija subceličnih proteomov sta potrebna za boljše razumevanje odziva rastlin na stres ter tudi za razvoj sort tolerantnih na stres. Prihodnje raziskave se morajo tudi bolj usmeriti v analizo posttranslacijskih modifikacij proteinov ter njihovo spreminjanje pri rastlinah v stresnih razmerah. Veliko število različnih modifikacij, ki pogosto spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti proteinov, je samo eden od izzivov proteomike. Proteinske modifikacije, ki otežujejo analizo, so pogosto samo začasno prisotne, časovno in mestno specifične (Reinders in Sickmann, 2007).

Povezava informacij proteomike z ostalimi podatki, pridobljenimi s pomočjo metod »omik«, zlasti z metabolomiko in transkriptomiko, omogoča učinkovito strategijo preučevanja sušnega stresa rastlin ter s tem preučevanje celičnih poti in mehanizmov, ki so potrebni za razumevanje tolerance rastlin na sušni stres (Gupta in sod., 2013).

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših raziskav sušnega stresa pri metuljnicah na področju proteomike.**Table 1:** A summary of drought stress studies using proteomics in major legume species.

Metuljnica	Tkivo/ del celice	Opis stresa	Metoda*	Število identificiranih proteinov s spremenjenimi vsebnostmi v suši	Referenca
trnata meteljka	noduli	10 tednov stare rastline, brez zalivanja za 3 in 6 dni	2D LC-MS/MS	377 proteinov rastlin**	Larrainzar in sod. (2007)
trnata meteljka	noduli	10 tednov stare rastline, brez zalivanja za 3 in 6 dni	LC-MS/MS	141 proteinov rastlin in 169 proteinov bakterij**	Larrainzar in sod. (2009)
soja	korenine	mlade kaleče rastline pri vodnem potencialu -1,6 MPa za 3 dni	2D-MALDI TOF MS/MS	27	Yamaguchi in sod. (2010)
soja	korenine	2 tedna stare rastline, brez zalivanja za 5 dni	2D-MALDI TOF	28	Alam in sod. (2010)
soja	listi, hipokotil, korenine	3 dni stare rastline, 10 % PEG ali brez zalivanja za 4 dni	2D LC-MS/MS	51 proteinov v listih, 49 v hipokotilu, 60 v koreninah	Mohammadi in sod. (2012)
soja	plazmalema	2 dni stare rastline, 10 % PEG za 2 dni	2D LC-MS/MS ter LC-MS/MS	12 proteinov iz gelov ter 86 iz LC-MS/MS	Nouri in sod. (2010)
čičerika	jedro	3 tedne stare rastline, brez zalivanja do 6 dni	2D LC-MS/TOF	147	Pandey in sod. (2008)
čičerika	zunajcelični matriks	3 tedne stare rastline, brez zalivanja za 7 dni	2D LC-MS/TOF	134	Bhushan in sod. (2007)
čičerika	zunajcelični matriks	3 tedne stare rastline, brez zalivanja za 8 dni	2D LC-MS/TOF	81	Bhushan in sod. (2011)
čičerika	jedro	3 tedne stare rastline, brez zalivanja za 6 dni	2D LC-MS/MS	75	Subba in sod. (2013)
čičerika	membrane	3 tedne stare rastline, brez zalivanja za 5 dni	2D MALDI-TOF/TOF	95	Jaiswal in sod. (2014)
arašidi	listi	67 dni stare rastline, brez zalivanja za 7 dni	2D MALDI TOF MS in Q-TOF MS/MS	49	Kottapalli in sod. (2009)
arašidi	semena	2 tedna stare rastline, poseben režim zalivanja, pobirali 110 dni stare rastline v stresu	1D LC-MS/MS	93	Kottapalli in sod. (2013)
grah	noduli	4 tedne stare rastline, brez zalivanja za 7 dni	2D MALDI-TOF/TOF	18	Irar in sod. (2014)
grah	mitohondriji	10 dni stare rastline, brez zalivanja 7 dni	2D Q-TOF	33	Taylor in sod. (2005)
lucerna	listi	91 dni stare rastline, brez zalivanja 7 dni	2D LC-MS/MS	26	Aranjuelo in sod. (2011)
mungo fižol	korenine	30 dni stare rastline, brez zalivanja za 3 in 6 dni	2D MALDI-TOF/TOF	26	Sengupta in sod. (2011)
navadni fižol	listi	5 tednov stare rastline, brez zalivanja za 12 in 17 dni	2D LC-MS/MS	58 proteinov pri tolerantni sorti, 64 pri občutljivi sorti	Zdražnik in sod. (2013)

*2D – dvodimenzionalna elektroforeza; LC-MS/MS – tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo; MALDI – ionizacija s pomočjo laserske svetlobe; TOF – analizator na čas preleta ionov; Q – kvadrupolni analizator

** število vseh identificiranih proteinov

4 ZAKLJUČKI

Sušni stres spada med abiotične stresne dejavnike, ki vplivajo na slabši pridelek kmetijsko pomembnih rastlin, med katere uvrščamo tudi metuljnice. Odziv metuljnic na sušo še ni podrobno raziskan. Največ proteomskih raziskav sušnega stresa je bilo opravljenih na modelnih rastlinah, kot sta trnata meteljka in soja, ter na nekaterih drugih metuljnicah, kot so čičerika, arašidi, grah, lucerna

in fižol. Preučevanje proteinov, povezanih z odzivom na sušo, pomaga k razumevanju molekularnih mehanizmov odziva na sušo, kar je bistveno za razvoj tolerantnih sort, sami rezultati identifikacije proteinov pa so osnova za nadaljnje raziskave odziva na sušo pri metuljnicah, ki imajo pomembno vlogo v prehrani ljudi in krmi živali.

5 VIRI

- 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 Soil*, 333: 491-505; DOI: 10.1007/s11104-010-0365-7
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avicé J.C., Nogués S. 2011. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(1):111-123; DOI: 10.1093/jxb/erq249
- Barkla B.J., Vera-Estrella R., Pantoja O. 2013. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics*, 13, 12-13: 1801-1815
- Bhushan D., Jaiswal D.K., Ray D., Basu D., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. 2011. Dehydration-responsive reversible and irreversible changes in the extracellular matrix: comparative proteomics of chickpea genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Proteome Research*, 10, 4: 2027-2046; DOI: 10.1021/pr200010f
- Bhushan D., Pandey A., Choudhary M.K., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. 2007. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 11: 1868-1884; DOI: 10.1074/mcp.M700015-MCP200
- Bray E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 4: 1035-1040
- Caruso G., Cavaliere C., Foglia P., Gubbiotti R., Samperi R., Laganà A. 2009. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177, 6: 570-576; DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.08.007
- CGIAR Research program on grain legume. 2012. ICRISAT, CIAT, ICARDA, IITA: 236 str.
- http://www.icrisat.org/crp/CRP3.5_Grain_Legumes_15Aug12.pdf (september, 2014)
- Corthals G.L., Rose K. 2007. Quantitation in proteomics. V: *Proteome research: concepts, technology and application*. Wilkins M.R., Appel R.D., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (eds.). 2nd ed. Berlin, Springer: 69-93
- Gupta B., Saha J., Sengupta A., Gupta K. 2013. Plant abiotic stress: 'omics' approach. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 1: e108. doi:10.4172/2329-
- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S., Salekdeh G.H. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5: 950-960; DOI: 10.1002/pmic.200401101
- Hossain Z., Khatoon A., Komatsu S. 2013. Soybean proteomics for unraveling abiotic stress response mechanism. *Journal of Proteome Research*, 12, 11: 4670-4684; DOI: 10.1021/pr400604b
- Irar S., González E.M., Arrese-Igor C., Marino D. 2014. A proteomic approach reveals new actors of nodule response to drought in split-root grown pea plants. *Physiologia Plantarum*, 152, 4: 634-645; DOI: 10.1111/ppl.12214
- Jaiswal D.K., Mishra P., Subba P., Rathi D., Chakraborty S., Chakraborty N. 2014. Membrane-associated proteomics of chickpea identifies Sad1/UNC-84 protein (CaSUN1), a novel component of dehydration signaling. *Scientific Reports*, 4: 4177; DOI: 10.1038/srep04177
- Jorrín-Novo J.V., Maldonado A.M., Echevarría-Zomeño S., Valledor L., Castillejo M.A., Curto M., Valero J., Sghaier B., Donoso G., Redondo I. 2009. Plant proteomics update (2007-2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and

- expand biological knowledge. *Journal of Proteomics*, 72, 3: 285-314; DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.026
- Kajfež-Bogataj L. 2005. Podnebne spremembe in ranljivost kmetijstva. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 1: 25-40
- Kocjan Ačko D., Tolar Š., Šantavec I. 2005. Stročnice v kolobarju slovenskih ekoloških kmetij. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 1: 125 – 134
- Kosová K., Vítámvás P., Prásil I.T., Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress- contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74: 1301-1322; DOI: 10.1016/j.jprot.2011.02.006
- Kottapalli K.R., Rakwal R., Shibato J., Burow G., Tissue D., Burke J., Puppala N., Burow M., Payton P. 2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell & Environment*, 32: 380-407; DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01933.x
- Kottapalli K.R., Zabet-Moghaddam M., Rowland D., Faircloth W., Mirzaei M., Haynes P.A., Payton P. 2013. Shotgun label-free quantitative proteomics of water-deficit-stressed midmature peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed. *Journal of Proteome Research*, 12, 11: 5048-5057; DOI: 10.1021/pr400936d
- Larrainzar E., Wienkoop S., Scherling C., Kempa S., Ladrera R., Arrese-Igor C., Weckwerth W., González EM. 2009. Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 1565-1576; DOI: 10.1094/MPMI-22-12-1565
- Larrainzar E., Wienkoop S., Weckwerth W., Ladrera R., Arrese-Igor C., González E. 2007. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiology*, 144: 1495-1507; DOI: 10.1104/pp.107.101618
- Lei Z., Nagaraj S., Watson B., Summer L. 2007. Proteomics of *Medicago truncatula*. V: Plant proteomics. Šamaj J., Thelen J. (eds.). Berlin, Springer: 121-136
- Magyar-Tábori K., Mendler-Drienyovszki N., Dobránszki J. 2011. Models and tools for studying drought stress responses in peas. *OMICS*, 15, 12: 829-838; DOI: 10.1089/omi.2011.0090
- Miklas P.N., Kelly J.D., Beebe S.E., Blair M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica*, 47: 105-131; DOI: 10.1007/s10681-006-4600-5
- Mohammadi P.P., Moieni A., Hiraga S., Komatsu S. 2012. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *Journal of Proteomics*, 75, 6: 1906-1923; DOI: 10.1016/j.jprot.2011.12.041
- Muneer S., Ahmad J., Bashir H., Qureshi M.I. 2012. Proteomics of nitrogen fixing nodules under various environmental stresses. *Plant Omics Journal*, 5, 2: 167-176
- Nouri MZ., Komatsu S. 2010. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics*, 10, 10: 1930-1945; DOI: 10.1002/pmic.200900632
- Pandey A., Chakraborty S., Datta A., Chakraborty N. 2008. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7: 88-107; DOI: 10.1074/mcp.M700314-MCP200
- Popelka J.C., Nancy Terryn N., Higgins T.J.V. 2004. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, 167, 2: 195-206; DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.03.027
- Popis vrtnarstva. 2000. Kmetijstvo in ribištvo. Ljubljana, Statistični Urad Republike Slovenije: 56 str. <http://www.stat.si/doc/pub/rr-765-01.pdf> (september, 2014)
- Ramachandra Reddy A., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202; DOI: 10.1016/j.jplph.2004.01.013
- Reddy D.S., Bhatnagar-Mathur P., Vadez V., Sharma K.K. 2012. Grain legumes (soybean, chickpea, and peanut): omics approaches to enhance abiotic stress tolerance. V: Improving crop resistance to abiotic stress, volume 1 & Volume 2, eds N. Tuteja, S. S. Gill, A. F. Tiburcio and R. Tuteja, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, str: 993-1030 doi: 10.1002/9783527632930.ch39; DOI: 10.1002/9783527632930.ch39
- Reinders J., Sickmann A. 2007. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomolecular Engineering*, 24, 2: 169-177; DOI: 10.1016/j.bioeng.2007.03.002
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J. Ghareyazie B., Bennett J. 2002a. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responiveness in rice.

- Field Crops Research, 76: 199-219; DOI: 10.1016/S0378-4290(02)00040-0
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J. 2002b. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2: 1131-1145; DOI: 10.1002/1615-9861(200209)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1
- Sengupta D., Kannan M., Reddy AR. 2011. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta*, 233, 6: 1111-1127; DOI: 10.1007/s00425-011-1365-4
- Sengupta D., Reddy AR. 2011. Water deficit as a regulatory switch for legume root responses. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 6: 914-917; DOI: 10.4161/psb.6.6.15340
- Subba P., Kumar R., Gayali S., Shekhar S., Parveen S., Pandey A., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. 2013. Characterisation of the nuclear proteome of a dehydration-sensitive cultivar of chickpea and comparative proteomic analysis with a tolerant cultivar. *Proteomics*, 13, 12-13: 1973-1992
- Swanson S.K., Washburn M.P. 2005. The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discovery Today*, 10, 10: 719-725; DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03450-1
- Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 8: 1122-1133; DOI: 10.1074/mcp.M400210-MCP200
- Timms J.F., Cramer R. 2008. Difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 8, 23-24: 4886-4897
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, 137: 949-960; DOI: 10.1104/pp.104.050815
- Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L., Summer L.W. 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology*, 131: 1104-1123; DOI: 10.1104/pp.102.019034
- Weckwerth W. 2008. Integration of metabolomics and proteomics in molecular plant physiology-coping with the complexity by data-dimensionality reduction. *Physiologia Plantarum*, 132, 2: 176-189; DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01011.x
- Yamaguchi M., Valliyodan B., Zhang J., Lenoble M., Yu O., Rogers E., Nguyen H., Sharp R. 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant, Cell and Environment*, 33: 223-243; DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02073.x
- Yang Z.B., Eticha D., Fühns H., Heintz D., Ayoub D., Van Dorselaer A., Schlingmann B., Rao I.M., Braun H.P., Horst W.J. 2013. Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 64, 18: 5569-5586; DOI: 10.1093/jxb/ert328
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2013. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, 78: 254-272; DOI: 10.1016/j.jprot.2012.09.021
- Zhang D., Ye F., Gao L., Liu X., Zhao X., Che Y., Wang H., Wang L., Wu J., Song D., Liu W., Xu H., Jiang B., Zhang W., Wang J., Lee P. 2009. Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer. *Cell Division*, 4, 1: 20, doi: 10.1186/1747-1028-4-20: 16 str.