

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK



Zakład Biochemii Produktów Naturalnych

Analiza proteomiczna liści jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) - poszukiwanie potencjalnych biomarkerów odporności na suszę

Paweł Rodziewicz

Promotor: Prof. dr hab. Maciej Stobiecki

Promotor pomocniczy: Dr Łukasz Marczak

POZNAŃ 2014

*Dziękuję swoim promotorom
prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu oraz **dr. Łukaszowi Marczakowi**
za nieocenioną pomoc i uwagi podczas wykonywania badań i pisania niniejszej pracy,
a także za okazaną życzliwość, wyrozumiałość i cierpliwość*

*Dziękuję **Klaudii Chmielewskiej, Basi Swarcewicz, Ani Wojakowskiej i Karolinie**
Kulak za wspaniałą atmosferę w pracy*

*Dziękuję **Pracownikom Zakładu Biochemii Produktów Naturalnych,**
a w szczególności Paniom **mgr Danucie Ciesiołce i Małgorzacie Zielińskiej**
za pomoc i życzliwość*

*Dziękuję **prof. dr hab. Pawłowi Krajewskiemu** z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki
Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu za pomoc w opracowaniu wyników oraz
przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych i statystycznych*

*Pracę dedykuję **Rodzicom i Jagódce***



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



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.

Oświadczam, że jestem stypendystą w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE	9
1.1. Jęczmień – roślina uprawna i modelowa.....	9
1.2. Stresy abiotyczne i ich wpływ na rozwój, wzrost i produktywność roślin uprawnych.....	10
1.2.1. Oddziaływania pomiędzy stresami abiotycznymi	13
1.3. Susza	15
1.3.1. Strategie odpowiedzi na suszę.....	16
1.3.2. Przekazywanie sygnałów w suszy.....	17
1.3.2.1. Osmosensory	18
1.3.2.2. Rola kwasu abscysynowego.....	19
1.3.2.3. Kinazy aktywowane mitogenami (MAPK).....	20
1.3.2.4. Reaktywne formy tlenu	22
1.3.3. Geny zaangażowane w odpowiedź roślin na suszę	25
1.3.3.1. Regulacja ekspresji genów niezależnych od kwasu abscysynowego	25
1.3.3.2. Regulacja ekspresji genów zależnych od kwasu abscysynowego.....	26
1.3.4. Wpływ suszy na przebieg fotosyntezy	28
1.4. Proteomika	29
1.4.1. Elektroforeza dwukierunkowa	31
1.4.2. Rola spektrometrii mas w badaniach proteomicznych.....	35
1.4.2.1. Strategie identyfikacji białek.....	36
1.4.3. Narzędzia bioinformatyczne i interpretacja wyników.....	41
1.4.4. Eksploracja danych proteomicznych.....	43
1.4.5. Wykorzystanie proteomiki w poszukiwaniu biomarkerów odporności na suszę.....	46
1.5. Strategie hodowli roślin odpornych na suszę	49
2. CEL PRACY	53
3. MATERIAŁY I METODY	54
3.1. Odczynniki	54
3.2. Materiał roślinny i warunki hodowli.....	57
3.3. Izolacja i oczyszczanie białek cytoplazmatycznych z tkanki liściowej	58
3.4. Dwukierunkowa elektroforeza białek	59
3.5. Analiza statystyczna.....	63
3.5.1. Całościowa analiza zmian profili akumulacji białek (analiza niecelowana).....	64
3.6. Trawienie enzymatyczne białek z żelu poliakrylamidowego.....	66
3.7. Identyfikacja białek metodami spektrometrii mas	67
4. WYNIKI.....	70
4.1. Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych.....	70
4.2. Analiza proteomiczna populacji mapującej	88

5.	DYSKUSJA	123
6.	WNIOSKI	151
7.	STRESZCZENIE	153
8.	LITERATURA.....	155
9.	SUPLEMENT	178

WYKAZ SKRÓTÓW

- 2D-DIGE** – dwukierunkowa elektroforeza różnicowa (ang. *two dimensional differential gel electrophoresis*)
- 5'UTR** – rejon sekwencji nieulegającej translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)
- ABA** – kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid*)
- ABRE** – element cis odpowiedzi na kwas abscysynowy (ang. *ABA-responsive element*)
- ADP** – adenozy-5'-difosforan (ang. *adenosine diphosphate*)
- ANOVA** – analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
- AREB** – białko wiążące się z ABRE (ang. *ABRE-binding protein*)
- ABF** – czynniki wiążące się z ABRE (ang. *ABRE-binding factor*)
- ATP** – adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
- bZIP** – białko z posiadające motyw zamka leucynowego (ang. *basic domain leucine zipper*)
- CAM** – kwasowy metabolizm węgla gruboszowatych (ang. *crassulacean acid metabolism*)
- cDNA** – DNA komplementarny do mRNA (ang. *complementary DNA*)
- CDPK** – kinaza zależna od wapnia (ang. *calcium-dependent protein kinase*)
- CID** – kolizyjnie indukowana dysocjacja (ang. *collision induced dissociation*)
- Clp** – kazeino-lityczna proteaza (ang. *caseino-lytic protease*)
- ClpC** – białko opiekuńcze kazeino-litycznej proteazy (ang. *caseino-lytic protease chaperone*)
- 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*)
- erd1** – gen wczesnej odpowiedzi na odwodnienie (ang. *early responsive to dehydration*)
- ESI** – jonizacja przez elektrozpraszanie (ang. *electrospray ionization*)
- EST** – krótkie sekwencje kodujące (ang. *expressed sequence tags*)
- 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*)
- HCA** – grupowanie hierarchiczne (ang. *hierarchical clustering analysis*)
- HK** – kinaza histydynowa (ang. *histidine kinase*)
- HSF** – czynnik transkrypcyjny białek szoku cieplnego (ang. *heat-shock transcription factor*)
- HSP** – białko szoku cieplnego (ang. *heat-shock protein*)
- ICA** – analiza składowych niezależnych (ang. *independent component analysis*)
- ICAT** – znakowanie izotopami wiążącymi cysteinę (ang. *isotope-coded affinity tag*)
- IEF** – izoelektroogniskowanie (ang. *isoelectrofocusing*)
- IT** – pułapka jonowa (ang. *ion trap*)
- iTRAQ** – znaczniki izobaryczne (ang. *isobaric tag for relative and absolute quantitation*)
- KAT1** – kanał kationowy (potasowy) (ang. *cation channel*)
- LEA** – białko 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*)
- MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen activated protein kinase*)
- MOWSE** – algorytm oparty o wyszukiwanie na podstawie masy molekularnej (ang. *molecular weight search*)
- mRNA** – matrycowy RNA (ang. *messenger RNA*)
- MudPIT** – wielowymiarowa technika identyfikacji białek (ang. *multidimensional protein identification technology*)
- NAC** – rodzina czynników transkrypcyjnych NAM/ATAF/CUC (ang. *transcription factor family NAM/ATAF/CUC*)
- NADPH** – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- PCA** – analiza śladowych głównych (ang. *principal component analysis*)
- PCO** – analiza współrzędnych głównych (ang. *principal coordinates analysis*)
- pI** – punkt izoelektryczny (ang. *isoelectric point*)
- PMF** – peptydowy odcisk palca (ang. *peptide mass fingerprinting*)
- PP2C** – fosfataza typu 2C (ang. *phosphatase type 2C*)
- PYR/PYL/RCARs** – białko odporności na pyrabaktin/białko podobne do białka odporności na pyrabaktin/składnik regulatorowy receptora ABA (ang. *pyracbactin resistance/pyracbactin resistance-like/regulatory component of ABA receptor*)
- Q** – kwadrupol (ang. *quadrupole*)
- QTL** – locus locus cechy ilościowej (ang. *quantitative trait locus*)
- RFT** – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
- RIL** – rekombinacyjne linie wsobne (ang. *recombinant inbred line*)
- RNA** – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)
- RuBisCO** – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (ang. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*)
- RuBP** – rybulozo-1,5-bisfosforan (ang. *ribulose-1,5-bisphosphate*)
- 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*)
- SLAC1** – kanał anionowy (ang. *slow anion channel*)
- TOF** – analizator czasu przelotu (ang. *time of flight*)
- UPGMA** – metodą średnich odległości między obiektami w skupieniach (ang. *unweighted paired group average linkage*)
- UPR** – kaskada odpowiedzi na nieufałdowane białka (ang. *unfolded protein response*)

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1. Jęczmień – roślina uprawna i modelowa

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) zaliczany jest do rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), do plemienia pszenicowatych (*Triticeae*) i podplemienia jęczmieniolatych (*Hordeinae*). W rodzaju *Hordeum* występuje 36 gatunków, które dzieli się na jęczmiona dzikie (ssp. *spontanea*) i jęczmiona uprawne (ssp. *cerealisa*). W zależności od liczby kłosek wśród jęczmieni uprawnych wyróżnia się jęczmień wielorzędowy, czterorzędowy, do którego należy większość odmian uprawianych w Europie i dworzędowy (Gąsiorowski i Brzeziński, 1997).

Jęczmień uprawny (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) jest jedną z najwcześniej udomowionych roślin zbożowych. Ślady archeologiczne (pozostałości nasion) znalezione na różnych obszarach Żyznego Półksiężycy, zwłaszcza Izraela i Jordanii, wskazują, że uprawiano go już około 10 000 lat p.n.e. (Badr i in., 2000; Jakob i in., 2014).

Pod względem powierzchni upraw, jak i wielkości produkcji, jęczmień zwyczajny stanowi czwarte, po kukurydzy, ryżu i pszenicy, najpowszechniej uprawiane zboże na świecie. W 2012 roku powierzchnia upraw tego zboża na świecie wynosiła 49,5 mln hektarów, natomiast produkcja 133 milionów ton. Wśród zbóż podstawowych w Polsce jęczmień zwyczajny zajmuje drugie miejsce po pszenicy pod względem powierzchni upraw oraz wielkości produkcji, które w 2012 roku wyniosły odpowiednio 1161 tys. hektarów i 4180 tys. ton (GUS, 2012). W strukturze zasiewów jęczmienia dominuje forma jara (87% powierzchni zasiewów) nad formą ozimą (13%), ma ona również największe znaczenie pośród zbóż jarych w polskim rolnictwie. Około 55%-60% światowej produkcji jęczmienia jest uprawiane z przeznaczeniem na paszę dla zwierząt, 30%-40% stanowi surowiec do produkcji słodu dla przemysłu browarniczego oraz gorzelniczego, 2%-3% wykorzystuje się jako żywność, np. w postaci kaszy, a około 5% przeznacza się na materiał siewny. Jęczmień jest jednym z najlepiej dostosowanych zbóż do wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Cechuje go stosunkowo wysoka odporność na stresy abiotyczne takie jak susza, zasolenie czy zimno. Głównie uprawiany jest w klimacie umiarkowanym oraz subtropikalnym półsuchym. Nie toleruje natomiast ciepłych klimatów o wysokiej wilgotności (Gąsiorowski H. i Brzeziński W., 1997).

Dzięki posiadanym przez siebie cechom, oprócz ogromnego znaczenia dla gospodarki, jęczmień zwyczajny stanowi także roślinę modelową wykorzystywaną w badaniach nad biologią roślin zbożowych. Posiada diploidalny genom liczący 5.3 Gpz o podstawowej liczbie chromosomów $n=7$ ($2n=14$; numerowanych od 1H do 7H), co znacznie ułatwia analizę genetyczną (Mayer i in., 2011, 2012). Baza krótkich sekwencji kodujących (EST, ang. *expressed sequence tags*) umożliwiła utworzenie mikromacierzy (Close i in., 2004) oraz map genetycznych (Potokina i in., 2008; Stein i in., 2007), co z kolei pozwoliło na badania funkcjonalne genomu i analizy porównawcze z genomami innych zbóż (Bolot i in., 2009; Thiel i in., 2009). W 2012 roku została opublikowana fizyczna, genetyczna i funkcjonalna mapa genomu jęczmienia (Mayer i in., 2012). Jęczmień cechuje się także krótkim cyklem życiowym (ok. 90 dni) i łatwością uprawy w warunkach laboratoryjnych. Ponadto jest rośliną samopylną, co ułatwia tworzenie i selekcję mutantów oraz budowanie map genetycznych. Jego dziko rosnący przodek (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*) jest wykorzystywany jako źródło zmienności genetycznej w hodowli nowych odmian lepiej dostosowanych do zmieniających się warunków klimatycznych (Ellis, 2000).

1.2. Stresy abiotyczne i ich wpływ na rozwój, wzrost i produktywność roślin uprawnych

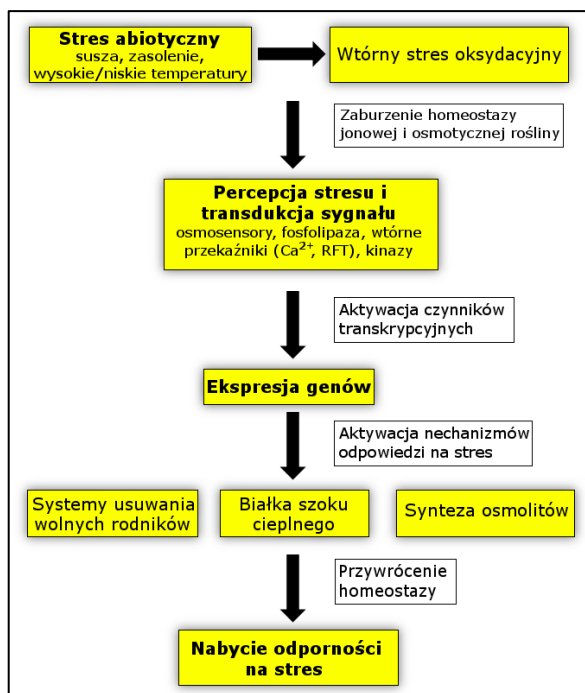
Rośliny jako organizmy osiadłe są nieustannie narażone na niekorzystne działanie czynników środowiskowych, zarówno biotycznych (infekcja organizmu patogennego) jak i abiotycznych (susza, zasolenie, nadmiar/niedobór światła, wysokie/niskie temperatury, promieniowanie ultrafioletowe czy metale ciężkie), które w znacznym stopniu ograniczają ich wzrost i rozwój (Hirayama i Shinozaki, 2010). Aby przetrwać muszą nieustannie reagować na zmieniające się warunki środowiska.

Stresy abiotyczne stanowią poważne zagrożenie dla rolnictwa i bezpieczeństwa żywnościowego całego świata. Uważa się je za główne źródło ograniczania produktywności roślin uprawnych (Reynolds i Tuberosa, 2008; Vinocur i Altman, 2005). Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa ponad 90% obszarów rolniczych na całym świecie jest w różnym stopniu poddana działaniu niekorzystnych czynników abiotycznych w okresie wegetacji roślin (Cramer i in., 2011).

Susza, zasolenie i wysokie temperatury mają największy wpływ na obniżanie plonów. Szacuje się, że w zależności od intensywności, czasu trwania i stadium rozwoju rośliny, w którym stres wystąpił, spadek produktywności upraw może sięgać nawet 50%. Obecnie na około 6% pól uprawnych i 30% terenów nawadnianych na całym świecie występuje problem znacznego zasolenia ziemi, a około 20% dotyczy problem suszy. Prognozuje się, że w przeciągu 40 lat wzrastający poziom zasolenia pól uprawnych spowoduje zmniejszenie areалу upraw o 50% (Bray i in., 2000).

Produkcja żywności wymaga znacznych nakładów wody, np. wyprodukowanie 1 kg kukurydzy wymaga ok. 900 litrów wody, dla tej samej ilości pszenicy i ryżu konieczne jest 1300 litrów. Obecnie 70% dostępnych zasobów przeznacza się na produkcję rolniczą. Przewidywane niekorzystne zmiany klimatyczne takie jak wzrost średnich temperatur, fale upałów oraz zmniejszenie ilości opadów spowodują wzrost powierzchni obszarów suchych i półsuchych na świecie, co wraz z postępującym zasoleniem doprowadzi do zwiększenia wykorzystania wody na cele rolnicze. Dodatkowo, aby zaspokoić wymagania żywieniowe rosnącej populacji ludzi, która, według różnych kalkulacji, ma wynosić 9 mld do roku 2050, produkcja żywności będzie musiała wzrosnąć niemalże dwukrotnie (Ray, i in., 2013). Uważa się, że wzrost produkcji będzie musiał pochodzić z lepszego plonowania roślin uprawnych na obecnie uprawianych ziemiach, ze względu na niewielki potencjał rozszerzania upraw na kolejne tereny. Aby sprostać temu problemowi konieczne jest tworzenie nowych odmian roślin charakteryzujących się wyższym plonem, stabilnym podczas działania stresów abiotycznych i lepiej wykorzystujących dostępne zasoby wodne (Cominelli i in., 2013).

Odpowiedź roślin na niekorzystne czynniki abiotyczne jest zjawiskiem bardzo złożonym, w które zaangażowanych jest wiele genów i mechanizmów biochemiczno-molekularnych (ryc. 1.1.) (Wang i in., 2000). Obserwowane zmiany dotyczą m.in. transkryptomu (Ozturk i in., 2002; Talame i in., 2006), metabolomu (Kaplan i in., 2004) i proteomu (Ford i in., 2011).



Ryc.1.1. Schemat odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne (według: Wang i in., 2003).

Dzięki rozwojowi technik identyfikacji poszczególnych klas związków, coraz większa liczba genów, transkryptów, białek i metabolitów zaangażowanych w percepcję i odpowiedź rośliny jest identyfikowana. Zastosowanie holistycznego podejścia badawczego, jakim jest biologia systemów, umożliwia korelację danych z poszczególnych poziomów molekularnych i poznanie złożonych sieci oddziaływań pomiędzy wszystkimi poziomami molekularnymi, biorącymi udział w regulacji odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne (Moreno-Risueno i in., 2010; Urano i in., 2010). Wśród genów, które biorą udział w reakcji roślin na stresy abiotyczne można wyróżnić te zaangażowane w przekazywanie sygnałów podczas stresu i kontrolę transkrypcji oraz te bezpośrednio uczestniczące w odpowiedzi na stres. Do pierwszej grupy zalicza się m.in. kinazy aktywowane mitogenami (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinase*), kinazy zależne od wapnia (CDPK, ang. *calcium dependent protein kinase*), fosfolipazy oraz rodziny czynników transkrypcyjnych takich jak czynniki transkrypcyjne białek szoku cieplnego (HSF, ang. *heat-shock transcription factor*), czynniki DREB (ang. *dehydration responsive element binding*) oraz AREB (ang. *ABA-responsive element binding factor*). Produkty drugiej grupy genów są bezpośrednio zaangażowane w reakcję rośliny na stres abiotyczny. Ich funkcja polega m.in. na stabilizacji struktur komórkowych, a także zapobieganiu degradacji białek, lipidów i kwasów nukleinowych. W tej grupie wyróżnia się m.in. białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock proteins*),

opiekuńcze, późnej embriogenezy (LEA, ang. *late-embryogenesis abundant proteins*), a także białka zaangażowane w syntezę metabolitów np. o charakterze związków osmotycznie czynnych czy wchodzących w skład systemu neutralizowania wolnych rodników (Wang i in., 2003).

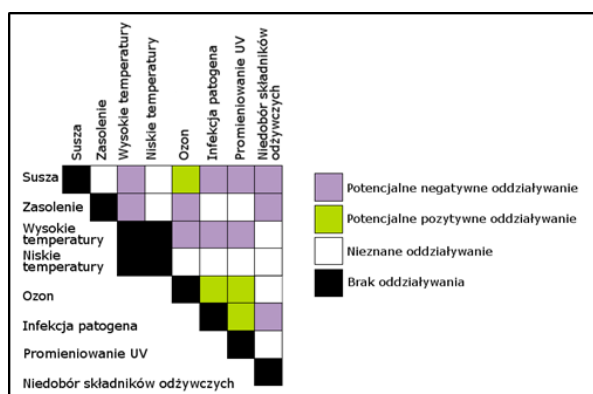
1.2.1. Oddziaływania pomiędzy stresami abiotycznymi

W warunkach naturalnych rośliny zwykle są narażone na działanie kilku niekorzystnych czynników jednocześnie. Susza, zasolenie i wysokie temperatury bardzo często są ze sobą powiązane i indukują powstanie podobnych uszkodzeń. Zarówno susza jak i zasolenie prowadzą do dehydratacji komórek i powodują powstanie stresu osmotycznego, co z kolei przekłada się na zaburzenie homeostazy i zakłóceń w dystrybucji jonów. Stresy abiotyczne powodują powstanie wtórnego stresu oksydacyjnego, który charakteryzuje się podwyższoną produkcją reaktywnych form tlenu i azotu oraz zaburzeniami w procesach ich usuwania.

W wielu przypadkach różne czynniki abiotyczne powodują aktywację podobnych mechanizmów odpowiedzi, do których należą zmiany w profilu ekspresji genów, synteza białek związanych ze stresem, wzrost akumulacji związków o charakterze przeciwutleniaczy i osmolitów. Aktywowane mechanizmy często dzielą wspólne ścieżki sygnałowe, aczkolwiek istnieje również specyficzność poszczególnych czynników stresowych i wynikające z tego różnice w odpowiedzi roślin (Knight i Knight, 2006). Analizy transkryptomu rośliny modelowej – rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.) poddanego działaniu suszy, zasolenia, chłodu i traktowaniu kwasem abscysynowym (ABA, ang. *abscisic acid*) wykazały wiele podobieństw w indukowaniu ekspresji genów (Seki i in., 2001; Stein i in., 2007). Z kolei w badaniach jęczmienia poddanego działaniu stresu osmotycznego i solnego analiza mikromacierzy cDNA (ang. *complementary DNA*) wykazała, że w przypadku obu stresów jedynie 18 genów wykazywało wzrost ekspresji, a 16 spadek. Natomiast 92 geny ulegały zmienionej ekspresji jedynie w stresie indukowanym solą, a 18 było charakterystycznych wyłącznie dla stresu osmotycznego wywołanego poli(tlenkiem etylu) (Ueda i in., 2004). W badaniach proteomicznych nad pszenicą poddaną działaniu stresów abiotycznych również obserwowano podobieństwa i różnice w reakcji na poszczególne stresy. Odpowiedź na

zasolenie spowodowała zmianę w profilu akumulacji większej ilości białek niż w przypadku suszy, jednocześnie większość białek o zmienionej akumulacji w suszy była również indukowana zasoleniem. Wśród różnic w reakcji roślin na poszczególne stresy znaleziono białka zaangażowane w percepcję stresu i przekazywanie sygnałów, natomiast podobieństwa dotyczyły głównie mechanizmów związanych z usuwaniem toksycznych produktów takich jak wolne rodniki oraz adaptacją szlaków metabolicznych (Peng i in., 2009).

Pomimo istnienia wielu podobieństw w reakcji roślin na stresy abiotyczne, wyniki badań, w których poddawano rośliny kombinacji różnych stresów np. suszy i wysokich temperatur, wskazują, że reakcja na dwa lub więcej niekorzystnych czynników środowiskowych jest unikalna i nie stanowi sumy reakcji na dane stresy aplikowane osobno (Rizhsky i in., 2004). Działanie kilku niekorzystnych czynników jednocześnie może wykazywać pozytywne interakcje (tzn. uruchamiać podobne mechanizmy molekularne), ale może także wymagać antagonistycznej odpowiedzi (Mittler, 2006) (ryc. 1.2.). Przykładowo, działanie wysokich temperatur wymusza na roślinach otwarcie aparatów szparkowych i wzmożenie transpiracji, dzięki której są w stanie obniżyć temperaturę liści. Jednakże, gdy wysokim temperaturom towarzyszy susza, aparaty szparkowe pozostają zamknięte ze względu na ograniczanie transpiracji. W efekcie doprowadzi to do zwiększenia temperatury liści (Rizhsky i in., 2002a). Z kolei w przypadku kombinacji wysokich temperatur i zasolenia wzmożona transpiracja spowodowałaby zwiększone pobieranie soli i zaburzenie równowagi jonowej. O tym, że odpowiedź roślin na równoczesne działanie kilku czynników stresowych stanowi nowy wzór odpowiedzi, świadczą również niepowodzenia w testowaniu niektórych roślin transgenicznych o zwiększonej tolerancji na konkretny stres w warunkach polowych, gdzie były narażone na równoczesne działanie wielu niekorzystnych czynników (Mittler, 2006).



Ryc.1.2. Potencjalne oddziaływania pomiędzy różnymi stresami środowiskowymi (według: Mittler, 2006).

1.3. Susza

Woda stanowi ok. 80-90% biomasy roślin i jest zaangażowana we wszystkie procesy fizjologiczne, które w nich zachodzą; zapewnia odpowiednie środowisko, w którym m.in. zachodzi transport substancji odżywczych i metabolitów. Pomimo tego, że woda zajmuje ok. 2/3 powierzchni Ziemi, susza występuje na coraz większej ilości obszarów i jest czynnikiem decydującym o wysokości plonów. Według definicji susza określana jest jako długotrwały okres bez opadów atmosferycznych. W cyklu rozwojowym suszy wyróżnia się suszę atmosferyczną – brak opadów przez 20 dni, suszę glebową – niedobór wody dostępnej dla roślin i suszę hydrologiczną – zmniejszenie zasobów wód powierzchniowych i podziemnych (Nowicka, 2005). Susza, jako stres abiotyczny, pojawia się gdy dostępność wody w glebie spada, a warunki atmosferyczne powodują dalszą jej utratę w wyniku ewapotranspiracji (Khajeh-Hosseini i in., 2003).

Oddziaływanie suszy na rośliny jest zjawiskiem złożonym w swojej naturze i powoduje ich reakcję na wszystkich poziomach organizacji, od molekularnego do morfologicznego. Niedobór wody stanowi jeden z głównych czynników ograniczających wzrost i rozwój roślin, a także produktywność w przypadku upraw (Farooq i in., 2009; Rampino i in., 2006; Reddy i in., 2004). Na poziomie fizjologicznym obserwowane zmiany dotyczą zamykania aparatów szparkowych, ograniczenia transpiracji, co prowadzi do zmniejszenia wymiany gazowej i stężenia CO₂ wewnątrz komórek miękiszu asymilacyjnego. W efekcie zostaje obniżona aktywność fotosyntetyczna roślin. Ciągły niedobór wody wpływa na obniżenie zdolności kiełkowania nasion oraz zahamowanie wzrostu siewek (Dornbos i in., 1989). Susza w roślinach powoduje także obniżenie potencjału wodnego komórek i utratę turgoru, co z kolei prowadzi do wzrostu stężenia metabolitów w cytoplazmie i zmian w elastyczności ścian komórkowych. Na poziomie biochemicznym w roślinach następuje akumulacja kwasu abscysynowego, który odgrywa m.in. rolę w przekazywaniu sygnałów, regulacją otwierania aparatów szparkowych i indukcją określonych (zależnych od siebie) genów. Pomimo tego, że aparat fotosyntetyczny posiada mechanizmy umożliwiające rozproszenie docierającej energii, w trakcie suszy, w warunkach obniżonej sprawności fotosyntetycznej, dochodzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników (stres oksydacyjny). Obserwowane są także zmiany w syntezie i akumulacji metabolitów, m.in. związków osmotycznie czynnych takich jak prolina, betaina glicynowa, poliaminy czy fruktany, dzięki którym roślina może dostosować swój potencjał osmotyczny. Osmoprotektanty są także zaangażowane w neutralizowanie wolnych rodników oraz zabezpieczają błony komórkowe

przed uszkodzeniami, a także zapobiegają niewłaściwemu fałdowaniu się białek (Hoekstra i in., 2001). Na poziomie molekularnym odpowiedzi roślin na suszę obserwowane zmiany dotyczą m.in. indukcji określonych genów, zaangażowanych w reakcję na stres, uczestniczących w syntezie ABA i genów zależnych od ABA, a także białek np. późnej embriogenezy, szoku cieplnego, zaangażowanych w usuwanie wolnych rodników czy uczestniczących w syntezie związków osmotycznie czynnych (Farooq i in., 2009).

1.3.1. Strategie odpowiedzi na suszę

W celu przystosowania się i przetrwania suszy rośliny wykształciły szereg mechanizmów morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych. Prawie we wszystkich roślinach obserwuje się zjawisko tolerancji na suszę, której zakres w zależności od gatunku, a nawet odmiany czy linii hodowlanej, jest różny. Tolerancja suszy przez rośliny jest definiowana jako zdolność do wzrostu, kwitnienia i plonowania w warunkach niedostatecznej ilości wody i wiąże się ze zmianami na poziomie molekularnym i przystosowaniami anatomicznymi całego organizmu. Wśród mechanizmów morfologiczno-fizjologicznych odpowiedzi na suszę wyróżnia się unikanie, ucieczkę oraz tolerowanie (Farooq i in., 2009).

Strategia unikania suszy polega na utrzymywaniu wysokiego potencjału wody w komórkach podczas stresu poprzez zatrzymywanie wody w komórkach lub/i ciągle jej dostarczanie do tkanek, np. poprzez rozległy system korzeniowy, który jest w stanie dotrzeć do wody zachowanej w głębszych warstwach gleby. Innym przystosowaniem do suszy jest ograniczenie transpiracji poprzez zmniejszenie powierzchni liści, ich kształtu, a także redukcji liczby, rozmiaru i otwarcia aparatów szparkowych, co jednak powoduje pogorszenie warunków wymiany gazowej pomiędzy rośliną a środowiskiem. Rośliny, które prowadzą szczególnie oszczędną gospodarkę wodną i są nieustannie narażone na deficyt wody wykształciły fotosyntezę typu CAM (ang. *Crassulacean acid metabolism*) oraz C4, dzięki czemu są w stanie utrzymać wysoką aktywność fotosyntetyczną w warunkach ograniczonej dostępności wody (Troughton i Card, 1975).

Strategia ucieczki przed suszą ma miejsce wówczas, gdy wegetacja rośliny jest dopasowana do okresu, w którym występuje dostępność wody w glebie, a cykl życiowy, łącznie z reprodukcją, zostaje ukończony przed wystąpieniem niedoboru wody. Ta strategia

jest realizowana przez rośliny pustynne, które cechuje szybki wzrost i krótki okres wegetacji (Araus i in., 2002).

Trzecią strategią jest tolerowanie suszy. Ten mechanizm polega na utrzymywaniu normalnych funkcji życiowych w warunkach stresu i obniżonego potencjału wodnego w komórkach. Ta strategia jest realizowana m.in. poprzez indukcję ekspresji specyficznych genów oraz akumulację określonych białek i metabolitów. Produkty tych genów uczestniczą m.in. w ochronie komórek przed dehydratacją i przekazywaniu sygnałów (Reddy i in., 2004).

1.3.2. Przekazywanie sygnałów w suszy

Aby przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe, rośliny wykształciły złożone mechanizmy umożliwiające wytworzenie optymalnej odpowiedzi do określonych, niekorzystnych warunków otoczenia. Pierwszym etapem uruchomienia mechanizmów molekularnych odpowiedzi jest odbiór sygnałów środowiskowych i przekazanie informacji o nich poprzez szlaki sygnałowe. Przykładowo, w wyniku zmiany potencjału osmotycznego wywołanego deficytem wody nastąpi zamknięcie aparatów szparkowych, zmniejszenie transpiracji, zahamowanie fotosyntezy i akumulacja związków kompatybilnych.

Szlaki sygnałowe biorące udział w odpowiedzi na stresy abiotyczne mogą być aktywowane przez kilka różnych stresów i/lub posiadać wspólne elementy, stanowiące miejsca wzajemnych oddziaływań pomiędzy różnymi ścieżkami sygnałowymi, nawet w różnych organach. Wiedza na temat przekazywania sygnałów w roślinach nieustannie się powiększa i już obecnie wiadomo, że pojedyncze szlaki, które dotychczas były badane, stanowią jedynie część złożonej sieci sygnałowej, w której występuje duża liczba rozgałęzień i wzajemnych oddziaływań, o czym m.in. może świadczyć indukowanie tych samych genów przez różne czynniki środowiskowe (Seki i in., 2001). Istnieją również takie szlaki sygnałowe, które są charakterystyczne dla konkretnego czynnika stresowego i prowadzą do postania specyficznej odpowiedzi na konkretny stres (Knight i Knight, 2006).

Zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, fosforylacja uważana jest za główny mechanizm przekazywania sygnałów w komórkach. Kinazy białkowe, które katalizują tę reakcję, wykorzystując adenosynotrifosforan (ATP, ang. *adenosine triphosphate*) jako donor fosforu, mogą podlegać auto-fosforylacji lub katalizować

fosforylację innych białek (Tran i in., 2007). Fitohormony jak kwas salicylowy, etylen, kwas abscysynowy, kwas jasmonowy również są zaangażowane w przekazywanie sygnałów jako element odpowiedzi na różnego rodzaju stresy środowiskowe. Ich działanie może mieć zarówno charakter synergistyczny jak i antagonistyczny. Wolne rodniki, będące efektem wtórnego stresu oksydacyjnego także pełnią kluczowe funkcje sygnałowe w komórce. W odpowiedzi roślin na suszę ogromne znaczenie dla odczuwania i przekazywania sygnałów pełnią komórki szparkowe, które obecnie stały się modelem wykorzystywanym w badaniach nad przekazywaniem sygnałów i ich wzajemnych interakcji (Schroeder i in., 2001).

1.3.2.1. Osmosensory

O ile duża liczba genów, transkryptów, białek i metabolitów uczestniczących w odpowiedzi na suszę została już poznana, wciąż niewiele jest wiadomo na temat tego jak roślina odbiera sygnał o niedoborze wody. W bakteriach rolę molekuł odbierających sygnały środowiskowe i przekazujących je do wnętrza komórki pełnią głównie błonowe kinazy histydynowe, które oprócz zmian osmotycznych wykrywają także kierunkowe bodźce chemiczne czy niedobór składników pokarmowych.

Kinaza histydynowa składa się z domeny sensorycznej zakotwiczonej w błonie i części transmisyjnej znajdującej się w cytoplazmie zbudowanej z domeny o aktywności kinazy i wiążącej ATP (Cai i Inouye, 2002). Bardziej złożony system występuje u drożdży (Posas i in., 1996) i roślin (Hwang i in., 2002; Tran i in., 2007; Urao i in., 2001). Roślinne kinazy histydynowe zostały zidentyfikowane m.in. w rzodkiewniku (Hwang i in., 2002), kukurydzy (Yonekura-Sakakibara i in., 2004), ryżu (Pareek i in., 2006), soi (Le i in., 2011) i topoli (Singh i Kumar, 2012). Roślinne kinazy histydynowe podzielono na dwie kategorie – będące lub nie będące receptorami etylenu. Biorą one udział w odbieraniu sygnałów indukowanych hormonami, zmianami środowiskowymi czy związanych z rozwojem (Tran i in., 2007; Urao i in., 2001).

Wykazano, że kinaza histydynowa HK1 z *Arabidopsis thaliana* posiada podobieństwo strukturalne do drożdżowego osmosensora SLN1. Z kolei mutanty drożdżowe nie posiadające dwóch osmosensorów (*sln1Δ sho1Δ*) nie przeżywają w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego. Komplementacja mutantów genem *athk1* spowodowała, że komórki

przeżywały w warunkach dehydratacji, a także zasolenia i niskich temperatur, a sam gen ulegał znacznej ekspresji (Urao i in., 1999). W badaniach nad roślinami transgenicznymi udowodniono, że HK1 jest pozytywnym regulatorem suszy, stresu solnego, a także odpowiedzi na ABA, podczas gdy HK2 i HK3 stanowią negatywne regulatory. Analiza transkryptomu wykazała także, że HK1 jest pozytywnym regulatorem genów związanych z odpowiedzią na stres zarówno tych zależnych od ABA jak i niezależnych (Tran i in., 2007).

1.3.2.2. Rola kwasu abscysynowego

Kwas abscysynowy jest fitohormonem, który pełni wiele funkcji związanych ze wzrostem i rozwojem roślin. Odgrywa rolę głównego regulatora odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe takie jak susza, zasolenie czy niskie temperatury. Opowiada za zamykanie aparatów szparkowych i w ten sposób wpływa na ograniczenie transpiracji. Kwas abscysynowy jest również zaangażowany w przekazywanie sygnału indukowanego zmianami osmotycznymi, m.in. niedoborem wody. Na wczesnych etapach wystąpienia stresu przekazywanie sygnału odbywa się przez moduł, na który składają się trzy klasy białek:

- białko odporności na pyrabaktin/białko podobne do białka odporności na pyrabaktin/składnik regulatorowy receptora ABA (PYR/PYL/RCARs, ang. *pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like/regulatory component of ABA receptor*), które stanowią receptory kwasu abscysynowego,
- fosfatazy typu 2C (PP2C, ang. *phosphatase type 2C*), będące negatywnymi regulatorami przekazywania sygnałów,
- kinazy SNF-1 (ang. *sucrose non-fermenting-1 protein kinases*), które są pozytywnymi regulatorami przekazywania sygnałów (Nishimura i in., 2010; Park i in., 2009).

Fosfatazy 2C są kluczowym regulatorem przekazywania sygnału indukowanego kwasem abscysynowym. W przypadku braku kwasu abscysynowego fosfataza 2C inaktywuje (defosforyluje) kinazę SNF-1. Nieufosforylowana kinaza nie jest w stanie przekazać sygnału do czynników transkrypcyjnych, kanałów anionowych i oksydaz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), aby zainicjować odpowiedź. Związanie się kwasu abscysynowego do receptorów PYR/PYL/RCARs wywołuje w nich zmiany konformacyjne umożliwiające inaktywację

fosfatazy 2C. Aktywna kinaza SNF-1 fosforyluje docelowe białka i indukuje właściwą odpowiedź (Danquah i in., 2014). Uruchomienie kaskady sygnałowej kwasu abscysynowego prowadzi do zmian w ekspresji genów. Kinazy SNF oddziałują na czynniki AREB/ABF (ang. *ABA responsive element binding protein/ABA binding factor*) bezpośrednio w jądrze. Procesy fosforylacji i defosforylacji odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnału indukowanego kwasem abscysynowym i są niezbędne do aktywacji białek AREB/ABF. Niektóre czynniki jak ABF1 i ABF4 mogą być również fosforylowane przez kinazy zależne od wapnia – CDPK4 i CDPK11 (ang. *calcium dependent protein kinase*) (Zhu i in., 2007).

Komórki szparkowe stanowią dobry model do badań nad odpowiedzią roślin na kwas abscysynowy i duża część dostępnej wiedzy na temat przekazywania sygnałów pochodzi właśnie z badań nad nimi (Sirichandra i in., 2009). Ścieżki sygnałowe kwasu abscysynowego kontrolujące kanały jonowe w aparatach szparkowych są krótkie. Aktywowana kwasem abscysynowym kinaza OST1, będąca homologiem kinaz SNF (nazwa pochodzi od fenotypu OPEN STOMATA – mutantów z supresją genu *ost1*) jest pozytywnym regulatorem zamykania aparatów szparkowych. Na drodze fosforylacji kinaza OST1 powoduje aktywację kanału anionowego SLAC1 (Geiger i in., 2009) i inhibicję kanału kationowego KAT1 (Sato i in., 2009). Kinaza OST1 aktywuje również błonową oksydazę NADPH, generującą H_2O_2 . Z kolei H_2O_2 prawdopodobnie uczestniczy w inaktywacji koreceptorów kwasu abscysynowego powodującego inhibicję kanału SLAC1 (Meinhard i in., 2002). Zwiększone stężenie nadtlenku wodoru może również powodować zwiększenie puli aktywnej kinazy OST1 na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego. Zamykanie się aparatów szparkowych jest wynikiem depolaryzacji komórek szparkowych spowodowanej uwolnieniem anionów przez kanał SLAC1. Utrata jonów powoduje utratę turgoru i zamknięcie aparatu (Vahisalu i in., 2008).

1.3.2.3. Kinazy aktywowane mitogenami (MAPK)

Kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinases*) stanowią uniwersalne moduły przewodzące sygnały w komórkach we wszystkich organizmach eukariotycznych. Przekazywanie i wzmacnianie odebranego sygnału środowiskowego odbywa się na zasadzie fosforylacji kolejnych kinaz białkowych i w efekcie

prowadzi do powstania odpowiedzi biochemicznej i fizjologicznej na dany bodziec. Podstawowa kaskada kinaz MAP składa się z trzech modułów, które są kolejno aktywowane przez fosforylację (Jonak, 2002):

- kinazy kinazy kinazy MAP (MAPKKK lub MKKK),
- kinazy kinazy MAP (MAPKK lub MKK)
- kinazy MAP (MAPK lub MPK),

Roślinne kaskady kinaz MAP są związane z wieloma aspektami odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano dotychczas 20 kinaz MAPK, 10 kinaz MAPKK i 60 kinaz MAPKKK (Ichimura i in., 2002). Analiza porównawcza sekwencji i charakterystycznych motywów obecnych w kinazach MAP pomiędzy *Arabidopsis* i innymi gatunkami pozwoliła na wyodrębnienie klas i podklas określonych kinaz MAP, jednakże w wielu przypadkach jednoznacznie określenie ortologów w innych gatunkach nie jest możliwe (Jonak, 2002).

U *Arabidopsis thaliana* kinaza MKK1 jest aktywowana w odpowiedzi na suszę, a także zasolenie, niskie temperatury oraz zranienie (Matsuoka i in., 2002). Aktywna kinaza MKK1 fosforyluje kinazę MPK4, chociaż, co ciekawe, w mutantach *mpk4* nie wykryto zmian w ekspresji genów w odpowiedzi na stresy abiotyczne w porównaniu do roślin kontrolnych (Petersen i in., 2000). W innych badaniach wykazano, że aktywacja kinaz MPK4 oraz ATMPK6 w wyniku działania stresu osmotycznego jest związana z fosforylacją tyrozyn, a nie z podwyższoną ilością mRNA lub białka (Ichimura i in., 2000). Z kolei stres oksydacyjny powodował u *Arabidopsis thaliana* aktywację kinaz MPK1, MPK2 (Ortiz-Masia i in., 2007), a także MPK3, MPK6 (Kovtun i in., 2000) oraz MPK4 (Nakagami i in., 2006) i MPK7 (Dóczy i in., 2007). Mutanty *dsm1* ryżu (ang. *drought-hypersensitive mutant1*) kinazy MAPKKK charakteryzowały się szybszą utratą wody w trakcie suszy niż rośliny kontrolne. Analiza mikromacierzy wykazała również obniżony poziom dwóch peroksydaz w roślinach z mutacją, co wiązało się ze zwiększoną podatnością na uszkodzenia będące skutkiem działalności wolnych rodników. Wykazano również, że gen *dsm1* ulega indukcji podczas suszy, zasolenia oraz traktowaniu kwasem abscysynowym, a jego nadekspresja spowodowała zwiększenie tolerancji na suszę w siewkach ryżu, co może świadczyć o zaangażowaniu kinazy we wczesną odpowiedź na suszę poprzez regulowanie metabolizmu wolnych rodników (Ning i in., 2010).

Kaskady kinaz MAP są także zaangażowane w niektóre reakcje indukowane kwasem abscysynowym, np. mechanizmy obronne, neutralizowanie wolnych rodników (Xing i in., 2008), przekazywanie sygnału w komórkach szparkowych (Jammes i in., 2009), jednakże

funkcje dla większości kinaz MAP indukowanych kwasem abscysynowym nie zostały dotychczas wyjaśnione.

1.3.2.4. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu (RFT) stanowią produkty częściowej redukcji tlenu. W przeciwieństwie do tlenu atmosferycznego mają zdolność utleniania biopolimerów oraz struktur komórkowych. Do produkcji RFT dochodzi nie tylko podczas stresu, ale także w optymalnych warunkach środowiskowych. Ilość RFT w komórkach jest kontrolowana wyłącznie przez stosunek ich produkcji do możliwości usuwania (Gill i Tuteja, 2010). RFT powstają głównie w chloroplastach w czasie fazy jasnej fotosyntezy, w peroksysomach w procesie fotorespiracji i β -oksydacji, a także w mitochondriach w trakcie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. U roślin dominującymi formami RFT są tlen singletowy, rodnik nadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy.

Wśród systemów biorących udział w usuwaniu RFT wyróżnia się składniki nieenzymatyczne, np. kwas askorbinowy, glutation i tokoferole oraz enzymy, np. dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza askorbinianowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, peroksyredoksyny (Mittler, 2002). Co ciekawe, analiza mutantów rzodkiewnika pospolitego oraz tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) posiadających jednocześnie uszkodzone geny kodujące peroksydazę askorbinianową i katalazę wykazała, że w większym stopniu tolerowały one różne stresy środowiskowe. Jednoczesny brak obu tych enzymów spowodował nową, unikalną sygnaturę RFT w komórkach, która uruchomiła mechanizmy związane z kontrolą cyklu komórkowego oraz naprawą DNA. W przypadku mutantów z uszkodzonym tylko jednym genem kodującym peroksydazę lub katalazę nie zaobserwowano podobnej odpowiedzi (Rizhsky i in., 2002b; Vanderauwera i in., 2011).

Podczas suszy, w wyniku zamknięcia aparatów szparkowych następuje ograniczenie wewnątrzkomórkowego stężenia CO_2 w komórkach miękiszu asymilacyjnego. Docierające do rośliny promieniowanie słoneczne powoduje przeniesienie elektronów na tlen molekularny i utworzenie rodnika nadtlenkowego w fotosystemie I w wyniku reakcji Mehler'a. Tlen singletowy jest generowany w fotosystemie II w wyniku wzbudzenia chlorofilu w centrum reakcji P680 oraz w kompleksie przechwytyjących światło (Asada, 2006). Obecna w błonie chloroplastu, w pobliżu fotosystemu I, miedziowo/cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa

przekształca rodnik nadtlenkowy do nadtlenku wodoru, który jest następnie przekształcany do wody przez membranową peroksydazę askorbinianową (Asada, 1999). Zmniejszona dostępność wody i stosunek stężenia CO₂ do O₂ w komórkach mezofilu prowadzi do intensyfikacji fotooddychania i produkcji glikolanu w chloroplastach. Utlenianie glikolanu w peroksysomach powoduje powstawanie dużych ilości nadtlenku wodoru. Jest on także generowany w procesie neutralizowania rodnika tlenowego. Występujące w peroksysomach katalazy są głównymi enzymami neutralizującymi nadtlenek wodoru (Møller, 2001). RFT są również generowane w mitochondriach, głównie w kompleksie I i III podczas transportu elektronów. W suszy w wyniku zaburzenia transportu elektronów oraz zwiększonego oddychania następuje wzrost produkcji RFT w mitochondriach. Zmieniony poziom RFT w mitochondriach prawdopodobnie zapoczątkowuje przekazywanie sygnału. Mitochondrialna alternatywna oksydaza oraz manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa biorą udział w regulowaniu tej ścieżki sygnałowej (Rhoads i Subbaiah, 2007).

W świetle ostatnich badań reaktywnym formom tlenu przypisuje się udział w przekazywaniu sygnałów związanych z odpowiedzią na stresy środowiskowe, a także programowaną śmiercią komórki i procesami rozwojowymi (Torres i Dangl, 2005). Susza, a także inne stresy abiotyczne, powodują zaburzenie homeostazy w roślinach i zwiększoną produkcję RFT. Rozpoznanie zaburzonego poziomu RFT przez receptory i enzymy może wpływać na uruchamianie mechanizmów obronnych. Rola RFT w przekazywaniu sygnałów jest ściśle powiązana ze ścieżkami sygnałowymi kwasu abscysynowego, jonami wapnia i cukrów (Cruz de Carvalho, 2008). Receptory, dzięki którym rośliny odbierają informacje o RFT nie zostały dotychczas poznane, jednakże postuluje się istnienie co najmniej trzech różnych mechanizmów, w których uczestniczą: receptory białkowe, czynniki transkrypcyjne wrażliwe na zmiany potencjału redoks oraz bezpośrednia inhibicja fosfataz przez RFT (Apel i Hirt, 2004; Mittler, 2002; Neill i in., 2002).

W porównaniu z innymi RFT nadtlenek wodoru jest bardzo stabilny (czas półtrwania wynosi ok. 1 ms), posiada także dobre właściwości dyfuzyjne, dzięki czemu może migrować z organelli, w których został wytworzony do cytozolu. Ponadto jest łatwo metabolizowany przez systemy przeciwutleniaczy. Obecnie, uważa się, że jest on kluczowym elementem biorącym udział w regulowaniu odpowiedzi roślin na suszę i spełnia funkcję wtórnego przekaźnika sygnału w odpowiedzi na stres. Nadtlenek wodoru jest również regulatorem potencjału redoks w komórkach, natomiast przeciwutleniacze stanowią modulatory generowanego przez niego sygnału (Foyer i Noctor, 2005). Ten związek bierze udział w mobilizacji jonów wapnia m.in. w komórkach aparatu szparkowego, fosforylacji białek

i ekspresji genów (Neill i in., 2002), a także aktywuje niektóre kinazy MAP (Desikan i in., 1999). Wykazano, że wpływa na akumulację związków o charakterze ochronnym, które są zaangażowane w regulację potencjału redoks w komórce. Pod wpływem H_2O_2 indukowane są białka związane z mechanizmami naprawczymi i ochronnymi m.in. białka późnej embriogenezy, białko naprawcze DNA oraz zaangażowane w przekazywanie sygnałów (Desikan i in., 2000). Badania transkryptomiczne nad *Arabidopsis thaliana* wykazały, że aż 175 genów podlega regulacji przez nadtlenek wodoru, z czego 113 podlegało zwiększonej ekspresji. W badaniach wykazano również, że wiele z tych genów jest indukowanych w przypadku niedoboru wody, a w ekspresji niektórych z nich uczestniczy H_2O_2 , np. kalmoduliny, kinazy MAP, czynnik transkrypcyjny DREB2A (ang. *dehydration responsive element binding*) (Desikan i in., 2001; Rentel i in., 2004).

RFT uczestniczą także w ścieżkach sygnałowych zależnych od kwasu abscysynowego, jednakże molekularne mechanizmy pośredniczące w produkcji RFT podczas sygnalizacji ABA nie zostały wciąż poznane. W komórkach szparkowych synteza H_2O_2 przez membranową oksydazę NADPH jest aktywowana przez kwas abscysynowy i uczestniczy w ich zamykaniu. Mutanty *Arabidopsis thaliana* posiadające uszkodzone geny *atrbohD* i *atrbohF*, kodujące dwie domeny katalityczne oksydazy NADPH charakteryzowały się zaburzeniami w indukowanym ABA zamykaniu aparatów szparkowych, produkcji RFT oraz mobilizacji jonów wapnia i aktywacji kanałów wapniowych. Dostarczenie H_2O_2 z zewnątrz spowodowało, że aparat szparkowy funkcjonował jak w roślinach kontrolnych, co świadczy o tym, że RFT mogą stanowić wtórne przekaźniki biorące udział w przekazywaniu sygnału zależnego od ABA (Kwak, 2003).

Cukry, jak glukoza, fruktoza czy sacharoza odgrywają dwojaką rolę w regulowaniu poziomu RFT. Mogą być związane ze szlakami metabolicznymi, które generują powstawanie RFT oraz uczestniczą w szlakach produkujących NADPH, np. szlaku pentozofosforanowym i w ten sposób brać udział w neutralizowaniu RFT. Cukry są zaangażowane w regulację ekspresji niektórych genów związanych z fotosyntezą oraz usuwaniem RFT. Związek pomiędzy cukrami a RFT jest skomplikowany ponieważ zarówno wysoki jak i niski poziom cukru może jednocześnie wzmacniać produkcję RFT w jednych szlakach, a w innych powodować zmniejszenie ich generowania (Couée i in., 2006).

1.3.3. Geny zaangażowane w odpowiedź roślin na suszę

Uzyskanie sekwencji całych genomów dla wielu roślin modelowych, a także uprawnnych znacznie przyspieszyło proces identyfikacji genów i czynników transkrypcyjnych, biorących udział w odpowiedzi roślin na suszę i inne stresy (Bolger i in., 2014). Technologia mikromacierzy wykorzystujących komplementarne cDNA lub syntetyczne oligonukleotydy stała się potężnym narzędziem w analizie profili ekspresji genów roślin poddanych działaniu różnych niekorzystnych czynników środowiskowych (Kreps i in., 2002; Seki i in., 2001).

Analizy molekularne i genetyczne wykazały, że ekspresją genów związanych z odpowiedzią na stresy abiotyczne zarządza kilka różnych systemów regulacji transkrypcji, wśród których zidentyfikowano zarówno czynniki *cis* i *trans*. Część nich jest kontrolowana przez kwas abscysynowy, a inne działają w sposób od niego niezależny (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005).

1.3.3.1. Regulacja ekspresji genów niezależnych od kwasu abscysynowego

Czynniki transkrypcyjne DREB (ang. *dehydration responsive element binding*) regulują ekspresję wielu genów indukowanych stresami abiotycznymi, przeważnie w sposób niezależny od kwasu abscysynowego. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano sześć genów DREB1 oraz osiem DREB2. Czynniki DREB oddziałują z elementami *cis* DRE/CRT (ang. *dehydration responsive element/C-repeat*) obecnymi w rejonie promotora genów indukowanych stresem. Ten element jest niezbędny do indukcji ekspresji genu *rd29a* m.in. w suszy (Yamaguchi-Shinozaki, 1994). Promotor tego genu, oprócz elementu DRE/CRT posiada w swojej strukturze element ABRE (ang. *ABA-responsive element*) przez co ulega ekspresji w sposób zależny i niezależny od kwasu abscysynowego (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005).

Podrodzina białek DREB2 jest indukowana przez suszę oraz wysokie zasolenie, natomiast nie jest aktywowana niskimi temperaturami i prowadzi do aktywacji wielu genów na wczesnych etapach stresu osmotycznego. Uważa się, że czynniki DREB2A oraz DREB2B odgrywają kluczowe role w indukcji genów w suszy (Liu i in., 1998; Nakashima i in., 2000). Czynniki należące do rodziny CBF/DREB1 są głównie indukowane przez niskie temperatury

(Gilmour i in., 1998), jednakże ich nadekspresja spowodowała m.in. wzrost tolerancji na suszę (Kasuga i in., 1999). Z kolei nadekspresja genu *dreb2a*, pozbawionego negatywnej domeny regulatorowej spowodowała zwiększenie tolerancji na suszę oraz indukcję genów związanych z odpowiedzią na ten stres (Sakuma i in., 2006). Rośliny ryżu z nadekspresją genu *dreb1* lub jego homologa z *Arabidopsis thaliana* charakteryzowały się podwyższoną tolerancją na suszę i niskie temperatury. Posiadały także zwiększone ilości związków kompatybilnych, m.in. proliny. Takie wyniki wskazują na to, że te czynniki transkrypcyjne spełniają podobne funkcje w odpowiedzi na stresy abiotyczne w roślinach jedno i dwuliściennych oraz mogą być wykorzystane do polepszania cech roślin użytkowych (Ito i in., 2006).

Gen *erd1* (ang. *early responsive to dehydration*) kodujący domenę regulatorową proteazy Clp (ang. *caseino-lytic protease*) reguluje odpowiedź na suszę w sposób niezależny od kwasu abscysynowego i jest także indukowany starzeniem się rośliny (Nakashima i in., 1997). W wyniku analizy promotora genu *erd1* zidentyfikowano dwa nowe elementy *cis* zaangażowane w odpowiedź roślin na niedobór wody (Simpson i in., 2003). Białka oddziałujące z tymi elementami zostały rozpoznane jako czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC (NAM, ang. *No Apical Meristem*; ATAF, ang. *Arabidopsis transcription activation factor*, CUC, ang. *cup-shaped cotyledon*) (Tran i in., 2004).

1.3.3.2. Regulacja ekspresji genów zależnych od kwasu abscysynowego

Większość genów, które są indukowane pod wpływem suszy ulega także aktywacji pod wpływem kwasu abscysynowego (Huang i in., 2008). Element regulatorowy ABRE jest głównym elementem *cis* promotora genów ulegających ekspresji w sposób zależny od kwasu abscysynowego.

Analiza rejonu promotora genu *rd29B* (ang. *responsive to dehydration*) reagującego na suszę, wykazała, że dwa elementy ABRE są wymagane do ekspresji tego genu. Czynniki transkrypcyjne AREB/ABF kontrolują ekspresję genów indukowanych przez kwas abscysynowy poprzez wiązanie się do elementów *cis* ABRE w rejonie promotora. Czynniki AREB/ABF stanowią głównie białka posiadające motyw zamka leucynowego (bZIP, ang. *basic domain leucine zipper*). W mutantach niewrażliwych na kwas abscysynowy *abi1* oraz z niedoborem kwasu abscysynowego *aba2* czynniki transkrypcyjne AREB/ABF posiadały

zmniejszoną aktywność, w przeciwieństwie do mutantów z nadwrażliwością na kwas abscysynowy (Uno i in., 2000). Nadekspresja ufosforylowanej, aktywnej formy czynnika AREB1 spowodowała aktywację genów zależnych od kwasu abscysynowego nawet w przypadku jego braku oraz podwyższenie tolerancji na suszę (Furiihata i in., 2006). Wyniki te wskazują, że do aktywacji czynników AREB/ABF konieczny jest sygnał zależny od kwasu abscysynowego, którym jest prawdopodobnie fosforylacja.

Indukcja genu *rd22* reagującego na suszę jest zależna od kwasu abscysynowego oraz wymaga obecności dwóch czynników transkrypcyjnych z rodziny MYB (ang. *myeloblastosis oncogene*) oraz MYC (ang. *myelocytomastosis oncogene*), które ulegają ekspresji dopiero po nagromadzeniu się w komórkach kwasu abscysynowego, co świadczy o ich roli w późniejszych etapach suszy. Nadekspresja tych czynników doprowadziła do podwyższenia zwiększenie na stresy osmotyczne oraz nadwrażliwości na kwas abscysynowy.

Ekspresja genu *rd26* kodującego czynnik transkrypcyjny NAC jest indukowana suszą, zasoleniem oraz kwasem abscysynowym. W mutantach z nadprodukcją tego czynnika obserwowano nadwrażliwość na kwas abscysynowy oraz wzrost ekspresji genów indukowanych suszą oraz kwasem abscysynowym, podczas gdy rośliny z represją tego genu były niewrażliwe na kwas abscysynowy (Fujita i in., 2004).

Wiele genów reagujących na suszę posiada zarówno elementy DRE/CRT jak i ABRE w rejonie promotora, które funkcjonują w dwóch różnych systemach regulacji ekspresji. Analiza elementów *cis* genu *rd29A* ujawniała, że oba rodzaje elementów mogą oddziaływać na siebie podczas ekspresji genów zależnych od kwasu abscysynowego (DRE/CRT jest elementem sprzęgającym ABRE), co świadczy o interakcji pomiędzy różnymi ścieżkami regulatorowymi (Narusaka i in., 2003). Indukowany suszą gen *cbf4*, kontrolowany przez kwas abscysynowy, umożliwia oddziaływanie pomiędzy czynnikiem DREB2 oraz CBF/DREB1, który ulega ekspresji w niskich temperaturach, co również wskazuje na to, że istnieją interakcje pomiędzy ścieżkami zależnymi i niezależnymi od kwasu abscysynowego (Haake, 2002).

1.3.4. Wpływ suszy na przebieg fotosyntezy

Jednym z głównych skutków jakie powoduje niedobór wody u roślin jest redukcja intensywności fotosyntezy (Lawlor i Cornic, 2002). Zamykanie aparatów szparkowych oraz w późniejszych etapach stresu, uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego stanowią główne czynniki ograniczające przebieg fotosyntezy.

Aparaty szparkowe są zamykane w celu ograniczenia ewapotranspiracji, co prowadzi do zmniejszenia dyfuzji CO₂ przez aparat szparkowy i komórki mezofilu. Sygnałem chemicznym, który powoduje indukowane suszą zamykanie aparatów szparkowych jest kwas abscysynowy, a sam sygnał jest generowany w korzeniach (Socias i in., 1997). Ustalono, że wraz z postępującym brakiem wody następuje intensyfikacja procesu zamykania się aparatów szparkowych, jednakże ich przewodnictwo nie jest wyłącznie kontrolowane przez dostępność wody w glebie. Na zamykanie się aparatów szparkowych mają również wpływ właściwości hydrauliczne i pH soku ksylemu (Jia i Davies, 2007), aktywność transferazy farnezylowej (Pei, 1998), fosforylacja fotosyntetyczna (Meyer i Genty, 1999), regeneracja rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP, ang. *ribulose-1,5-bisphosphate*), synteza ATP i aktywność karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO, ang. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*) (Lawlor, 2002).

Uszkodzenie metabolizmu aparatu fotosyntetycznego jest procesem bardziej złożonym, który ogranicza fotosyntezę, niż zamykanie aparatów szparkowych. Niedobór wody powoduje m.in. zmiany w składzie barwników fotosyntetycznych, uszkadza aparat fotosyntetyczny, zmniejsza aktywność enzymów biorących udział w cyklu Calvina, a także prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego i uszkodzeń biopolimerów (Reddy i in., 2004).

W warunkach zmniejszonego wiązania CO₂ przez RuBisCO, zwłaszcza gdy suszy towarzyszy duże nasłonecznienie i wysokie temperatury, szybkość wytwarzania siły redukcyjnej znacznie przewyższa możliwość jej wykorzystania w cyklu Calvina. Nagromadzenie się nadmiaru energii może spowodować uszkodzenia w aparacie fotosyntetycznym. Kluczowym mechanizmem pozwalającym na jej rozproszenie w postaci ciepła jest cykl ksantofilowy obecny w kompleksach przechwytyjących światło (Demmig-Adams i Adams, 1996). Aktywność RuBisCO jest modulowana przez CO₂ i Mg²⁺ oraz inhibitory (np. ufosforylowane cukry). W roślinach tytoniu poddanych działaniu suszy stwierdzono spadek aktywności tego enzymu, wynikający ze zmniejszenia aktywności katalitycznej enzymu, a nie samej jego aktywacji. Związanie się takich inhibitorów jak 2-

karboksy-D-arabinitol-1-fosforan w miejscu katalitycznym RuBisCO powoduje obniżenie jego zdolności do przyłączania CO₂, ale jednocześnie może zabezpieczać enzym przed proteolizą (Parry i in., 2002).

W warunkach silnego niedoboru wody spadek wydajności karboksylacji przez RuBisCO jest jeszcze większy ze względu na intensyfikację fotooddychania, a sam enzym działa bardziej jako oksygenaza (Noctor i in., 2002). Zaburzenia w fotofosforylacji prowadzą do zmniejszenia szybkości syntezy ATP i NADPH, co z kolei powoduje niewystarczającą regenerację RuBP (Lawlor, 2002; Tezara i in., 1999). Ponadto spadek względnej zawartości wody (RWC, ang. *relative water content*) w roślinie powoduje zmniejszenie aktywności enzymów biorących udział w cyklu Calvina (Fock, 2002). Wszystkie te aspekty konsekwencji przyczyniają się do ograniczenia intensywności fotosyntezy.

Podczas trwania suszy może również nastąpić wzrost stężenia cukrów rozpuszczalnych i jednoczesny spadek ilości skrobi (Chaves, 1991). Cukry rozpuszczalne, których poziom zmienia się pod wpływem suszy biorą udział w ekspresji genów z wiązanych z fotosyntezą (Chaves i Oliveira, 2004). Ponadto zmiana stosunku produktów końcowych fotosyntezy sacharozy i skrobi prowadzi do zaburzeń w transporcie nieorganicznego fosforu wzdłuż błony chloroplastów i wpływa na zahamowanie syntezy ATP (Tezara i in., 1999).

1.4. Proteomika

Termin „proteom” został po raz pierwszy użyty przez Marca Wilkinsa w 1995 roku jako określenie wszystkich białek kodowanych przez genom obecnych w komórce, tkance czy organizmie w konkretnych warunkach zewnętrznych i wewnętrznych, w określonym punkcie czasowym i rozwojowym organizmu (Wilkins i in., 1996). Analogicznie do pojęcia „genomika” wprowadzono pojęcie proteomiki.

Proteomika jest dyscypliną naukową, której nadrzędnym celem jest szybka identyfikacja wszystkich białek znajdujących się w komórce, tkance czy organizmie oraz poznanie zachodzących pomiędzy nimi, a także między białkami i innymi molekułami interakcji. Ponadto umożliwia śledzenie aktywności białek w określonych stadiach wzrostu i rozwoju organizmu i poznaniu roli jaką w nim pełnią w oddziaływaniu ze środowiskiem zewnętrznym.

Dynamika i zmienność proteomu są wynikiem różnic w aktywności genów, których ekspresja jest zależna od wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych. W przeciwieństwie do genomu, który jest relatywnie stały i niemalże identyczny dla wszystkich komórek danego organizmu, określony zestaw białek może być różny w poszczególnych komórkach czy tkankach, co znacznie utrudnia ich analizę.

Liczba genów kodujących białka sięga od kilkuset w bakteriach do dziesiątek tysięcy u ssaków, natomiast liczba białek w organizmie może być znacznie większa (Thelen, 2007). Białka są zbudowane z 20 różnych aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi, przez co są polimerami bardzo heterogennymi pod względem masy, sekwencji i właściwości fizyko-chemicznych. Szacuje się, że liczba białek kodowanych w ludzkim genomie może być nawet 100-krotnie większa niż liczba kodujących je genów m.in. z powodu alternatywnej obróbki mRNA (ang. *messenger RNA*) oraz modyfikacji potranslacyjnych (Neverova i Eyk, 2005).

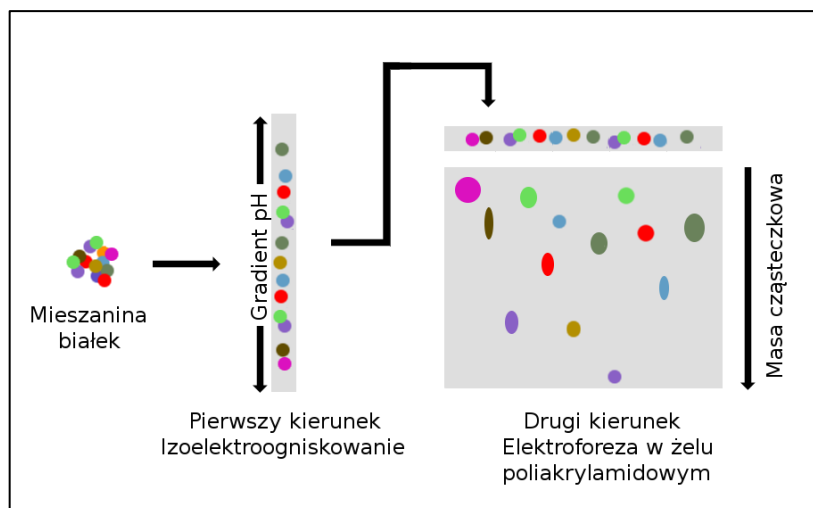
Wraz z rosnącą liczbą zsekwencjonowanych genomów, których liczba sięga już ponad 6000 (GOLD Database; <http://www.genomesonline.org/>) oraz rozwojem metod rozdzału i identyfikacji białek, zwłaszcza spektrometrii mas, proteomika stała się niezbędnym narzędziem wykorzystywanym w biologii molekularnej oraz biologii systemów (Aebersold i Mann, 2003). W zależności od stawianych celów, badania proteomiczne można podzielić na różne obszary: proteomikę opisową, porównawczą, modyfikacji potranslacyjnych, funkcjonalną czy oddziaływań. Powszechna jest także analiza subproteomów poszczególnych frakcji komórkowych i organelli w celu uproszczenia złożoności proteomu i zwiększenia czułości i specyficzności analiz (Stasyk i Huber, 2004).

Najstarszą technologią umożliwiającą realizację celów proteomiki stanowią dwukierunkowe rozdzały elektroforetyczne połączone z identyfikacją w spektrometrze masowym 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). Wykorzystanie chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas pozwoliło na przewyciężenie ograniczeń elektroforezy dwukierunkowej, a rozwinięcie technik znakowania i metod wolnych od znakowania pozwoliło na dokładną analizę ilościową (Patel i in., 2009).

1.4.1. Elektroforeza dwukierunkowa

Dwukierunkowe rozdziały elektroforetyczne zostały zapoczątkowane przez O'Farrella w 1975 roku i bardzo szybko metoda ta została zaadaptowana przez środowisko naukowe, gdyż umożliwiała analizę złożonych mieszanin białkowych i wysoką czułość detekcji (O'Farrell, 1975). Przełomem w dwukierunkowych rozdzielach elektroforetycznych było pojawienie się pasków żelowych z unieruchomionym gradientem pH, co znacznie poprawiło powtarzalność uzyskiwanych wyników. Dużym problem pozostawała wciąż identyfikacja białek. Dostępne były jedynie metody oparte o przeciwciała albo porównywanie migracji ze znanymi białkami. W latach 90-tych XX wieku pojawiły się pierwsze bazy danych zawierające obrazy żeli po dwukierunkowym rozdziale elektroforetycznym wraz z adnotacjami do zidentyfikowanych białek, jednakże nie zyskały one na dużej popularności ze względu na różnice w pozycji danego białka na żelach pochodzących z różnych laboratoriów (Rabilloud i in., 2010). Przełomem w identyfikacji białek był rozwój spektrometrii mas, która umożliwiła poznanie mas peptydów i porównanie ich do sekwencji genowych określonych organizmów. Obecnie techniki spektrometryczne są właściwie jedyną techniką dzięki której można w szybki sposób zidentyfikować dużą liczbę białek (Cottrell, 2011).

Elektroforeza dwukierunkowa białek w żelu poliakrylamidowym składa się z dwóch etapów rozdziału (ryc. 1.3.). Pierwszym z nich jest izoelektroogniskowanie (IEF, ang. *isoelectrofocusing*), w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego białka migrują w gradiencie pH, utworzonym przez mieszaninę amfolitów w obecności mocznika i detergentów, aż do momentu osiągnięcia swojego punktu izoelektrycznego (pI), który odpowiada takiej wartości pH, w której wypadkowy ładunek danego białka będzie równy 0. W drugim etapie białka są rozdzielane w warunkach denaturujących w obecności dodecylosiarczanu sodu w żelu poliakrylamidowym ze względu na swoją masę cząsteczkową (SDS-PAGE, ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Sarma i in., 2008).



Ryc. 1.3. Schemat zasady rozdzielania białek w elektroforezie dwukierunkowej (Sikorska i Rodziewicz, 2011).

Rozdzielczość elektroforezy dwukierunkowej w dużej mierze zależy od zakresu stosowanego pH i rozmiaru pasków żelowych stosowanych w pierwszym kierunku i zwykle pozwala na uwidocznienie od 1000 do 5000 białek (Görg i in., 2004).

Białka mogą być znakowane w różnych momentach analizy: przed izoelektroogniskowaniem, za pomocą radioizotopów lub barwników cyjanidowych, które nie zmieniają pI białka, pomiędzy rozdzielaniami, ale najczęściej białka są wybarwiane po zakończeniu dwóch rozdzielów. Jedną z najpopularniejszych i zarazem najprostszych metod detekcji białek jest barwienie roztworem koloidalnym błękitu Coomassie (ang. *Coomassie Brilliant Blue*), który jednak charakteryzuje się dość umiarkowaną czułością detekcji (~100ng) i długim czasem wybarwiania (Neuhoff i in., 1985). Barwienie srebrem zapewnia o wiele wyższą czułość detekcji (~1ng), jednakże posiada wąską rozpiętość tonalną, jest wieloetapowe oraz cechuje się niską powtarzalnością (Chevallet i in., 2006). Wysoką czułość (~2-10ng) i szeroką rozpiętość tonalną zapewniają natomiast barwniki fluorescencyjne, jednakże są drogie i wymagają dodatkowego sprzętu do wizualizacji rozdzielonych białek (Steinberg i in., 1996).

Właściwe przygotowanie żeli oraz wysoka powtarzalność pomiędzy elektroforegramami jest konieczna do wykonania poprawnej analizy. Różnice w rozdzielaniu elektroforetycznym spowodowane błędami technicznymi mogą maskować faktyczne zmiany ilościowe występujące w obrębie badanych próbek. Na wariacje pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami wpływają takie parametry jak: różny stopień absorpcji prób białkowych na paskach żelowych, różnice w gradiencie pH, błędy podczas przenoszenia pasków żelowych

na żel poliakrylamidowy, źle uformowany żel poliakrylamidowy czy różnice w natężeniu pola elektrycznego (Rabilloud i in., 2009).

Dwukierunkowa elektroforeza różnicowa (2D-DIGE, ang. *two dimensional differential gel electrophoresis*) pozwala na rozdział wielu próbek na jednym żelu, w tym samym czasie, co eliminuje problem braku powtarzalności pomiędzy poszczególnymi rozdzielaniami. W tej technice, przed izoelektroogniskowaniem, dwie próbki oraz standard wewnętrzny (mieszanina prób badanych) są znakowane barwinkami fluorescencyjnymi, które ulegają wzbudzeniu przy różnych długościach fali. próbki są następnie łączone i rozdzielane na tym samym żelu. Barwniki są tak skonstruowane, że nie powodują różnic w rozdziale w obu wymiarach, dzięki czemu to samo białko pochodzące z różnych prób będzie migrowało do jednej pozycji na żelu. Po zakończeniu elektroforezy żel jest skanowany przy długościach fali wzbudzenia użytych barwników, dzięki czemu uwidaczniane są rozdziały poszczególnych próbek (Marouga i in., 2005).

Analiza profili akumulacji poszczególnych białek na żelach dwóch lub więcej próbek odbywa się w zazwyczaj w programie komputerowym poprzez porównanie intensywności i powierzchni uwidocznionych wcześniej plamek. Pierwsze programy do analizy żeli po rozdziale dwukierunkowym pojawiły się w latach 80 ubiegłego wieku i wymagały specjalistycznego sprzętu. Dostępne obecnie oprogramowanie można podzielić na dwie kategorie.

W pierwszej grupie programów, do których należy m.in. Image Master Platinum 2D, pierwszym etapem analizy jest detekcja plamek, która odbywa się na podstawie ich geometrii, intensywności i powierzchni. W celu zwiększenia poprawności dopasowania plamek pomiędzy żelami (ang. *spot matching*) należy wcześniej wskazać punkty orientacyjne (ang. *landmarks*) reprezentujących te same białka na poszczególnych żelach i następnie przeprowadzić etap dopasowywania wybranych żeli pomiędzy sobą. Wadą tego rodzaju programów jest ich duża wrażliwość na przesunięcia pozycji białek na żelach, co w konsekwencji prowadzi do wielu błędów w łączeniu plamek. Druga generacja oprogramowania znacznie redukuje problem różnic w migracji białek na żelach. W tym podejściu elektroforegramy są najpierw dopasowane między sobą (ang. *image warping*), a następnie jest tworzony syntetyczny obraz żelu (ang. *fusion image*). Dopiero po tym procesie następuje proces wykrywania plamek.

W bezpośrednim porównaniu obu typów programów, analiza z wykorzystaniem programu drugiej generacji (Delta 2D, Decodon) pozwoliła na utworzenie większej ilości poprawnie połączonych plamek pomiędzy żelami oraz wykrycie większej liczby plamek

różnicujących niż analiza w programie I generacji (Proteomweaver, Bio-Rad). Oba oprogramowania wymagały ręcznej interwencji: proteomewiever – po etapie wykrywania plamek, delta 2D – na etapie tworzenia syntetycznego żelu. Jednakże, gdy korekcja przy tworzeniu syntetycznego obrazu w programie delta 2D była zrobiona dokładnie, poziom błędnie połączonych plamek był bliski zeru. Największym problemem obu programów były przypadki, w których plamki nie były wystarczająco rozdzielone, np. mała plamka w otoczeniu dużej plamki była traktowana na jednym żelu jako jedna, a na innym jako dwie (Eravci i in., 2007).

Wśród zalet elektroforezy dwukierunkowej należy wymienić wysoką rozdzielczość. Rozdział elektroforetyczny daje również informacje na temat masy oraz pI białka. Zastosowanie selektywnego barwienia umożliwia badanie modyfikacji potranslacyjnych jak fosforylacja i glikozylacja (Berth i in., 2007). Zaletą jest również to, że oba etapy elektroforezy dwukierunkowej są rozdzielone w czasie i przestrzeni, a sam sprzęt jest relatywnie tani. Technikę tę można łączyć także z innymi wykorzystywanymi w biologii molekularnej, np. z elektrotransferem i detekcją przeciwciałami. Z drugiej strony, znacznymi ograniczeniami tej metody jest brak możliwości analizy całego proteomu, ze względu na trudności w rozdzieleniu białek o małych i dużych masach cząsteczkowych oraz hydrofobowych. Najpopularniejsze metody detekcji charakteryzują się dosyć niską rozpiętością tonalną, a to uniemożliwia wykrycie subtelnych różnic w profilach akumulacji. Słabością metody są także różnice w stopniu rozdzielenia poszczególnych białek i przesunięcia ich pozycji, co dodatkowo utrudnia późniejszą analizę statystyczną. W przypadku białek o małej intensywności identyfikacja metodami MS może okazać się nieskuteczna. Często pojawia się niejednoznaczność identyfikacji spowodowana obecnością kilku białek pod postacią jednej plamki. Istnieje także tzw. problem „*deja vu*” tzn. w wielu różnych pracach eksperymentalnych identyfikowane są wciąż te same białka odpowiadające przeważnie za metabolizm centralny. Jest to w dużej mierze spowodowane tym, że na żelach po rozdzieleniu obserwuje się przede wszystkim białka, które występują w dużych ilościach w komórce. Natomiast białka zaangażowane w przekazywanie sygnałów, białka regulatorowe, czynniki transkrypcyjne, które występują w relatywnie niskiej ilości w komórce, bardzo często nie ujawniają się na żelach z powodu stosowania niewystarczająco czułych metod detekcji. Pomimo szeregu swoich wad elektroforeza dwukierunkowa wciąż pozostaje techniką szeroko wykorzystywaną w badaniach proteomicznych (Rabilloud i in., 2009).

1.4.2. Rola spektrometrii mas w badaniach proteomicznych

Przełomem w identyfikacji białek był rozwój miękkich metod jonizacji w spektrometrii mas w latach 80-tych XX wieku. Dwie metody: jonizacja przez elektrorozpraszanie (ESI, ang. *electrospray ionization*) (Fenn i in., 1989) oraz desorpcja/jonizacja laserem wspomagana matrycą (MALDI, ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (Karas i Hillenkamp, 1988; Tanaka i in., 1987) umożliwiły wydajną jonizację białek i peptydów.

Spektrometr masowy składa się ze komory jonizacyjnej, analizatora, który mierzy stosunek masy do ładunku (m/z) powstałych jonów oraz detektora, rejestrującego liczbę jonów o określonej wartości m/z . Pomiar w spektrometrze masowym odbywa się w fazie gazowej. Technika MALDI polega na desorpcji próbki ze studzienek na powierzchni płytki analitycznej po naświetleniu promieniami lasera. W celu zapewnienia prawidłowego przebiegu jonizacji przed analizą badany związek musi zostać zmieszany z właściwą matrycą. Podczas analiz białek najpowszechniej stosowanymi matrycami są: kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy, kwas gentyzynowy, kwas synapinowy i kwas ferulowy. W technice MALDI wykorzystuje się zwykle lasery działające w ultrafiolecie, np. azotowy (337nm), neodymowy Nd:YAG (355nm lub 266nm). Lasery emitujące światło w zakresie podczerwieni również znajdują zastosowanie w tej technice, ze względu na łagodniejszy przebieg jonizacji.

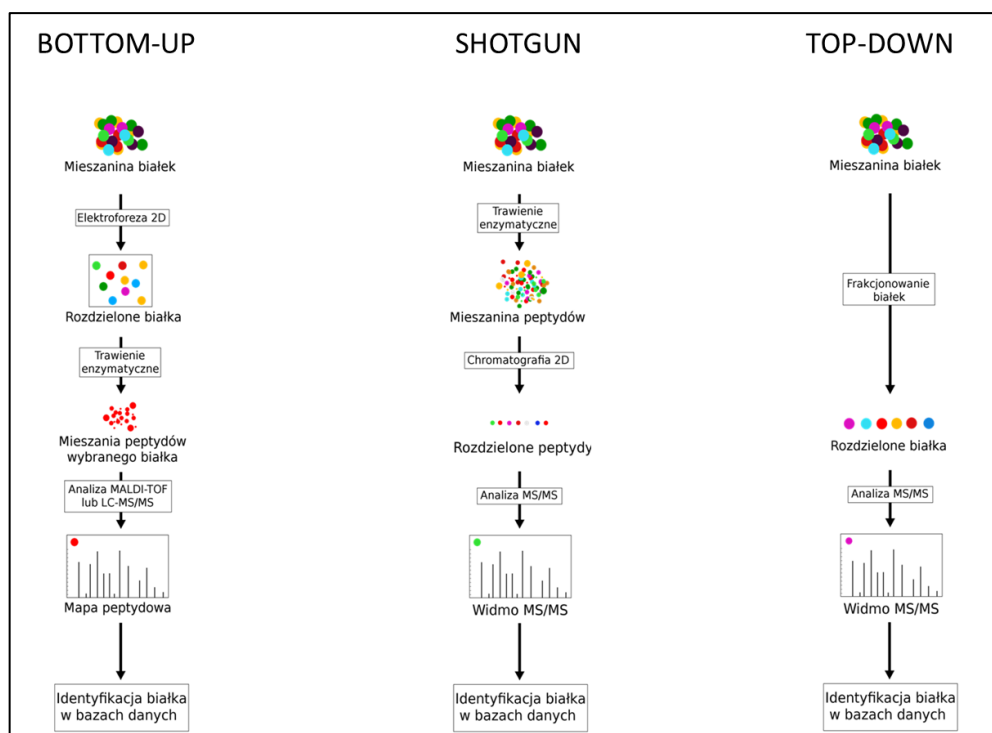
Proces jonizacji w technice MALDI jest dwustopniowy. Pierwszym etapem jest powstanie jonów w trakcie lub krótko po naświetleniu próbki wiązkami lasera. Zaabsorbowana energia wywołuje jonizację cząsteczek matrycy, a w reakcji wtórnej następuje jonizacja cząsteczek analizowanego związku, np. białka. Zjonizowane cząsteczki matrycy uczestniczą w jonizacji analitu poprzez transfer protonu. W trybie jonów dodatnich najczęściej obserwowanymi na widmie są protonowane cząsteczki badanego związku, tzn. składające się obojętnej cząsteczki analitu i przyłączonego protonu $[M+H]^+$, ale spotykane są również jony z przyłączonymi atomami sodu $[M+Na]^+$ lub potasu $[M+K]^+$. Powstające jony są najczęściej pojedynczo naładowane, choć w zależności od rodzaju zastosowanej matrycy i energii lasera mogą się również tworzyć jony wielokrotnie naładowane (Jurinke i in., 2004).

Kluczowymi parametrami analizatorów stosowanych w spektrometrach masowych są czułość, rozdzielczość, dokładność mierzonych mas. Do najpowszechniej wykorzystywanych analizatorów w badaniach proteomicznych należą: pułapka jonowa (IT, ang. *ion trap*), 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*). Analizator w spektrometrze może być pojedynczy lub występować w tandemie z innymi. Zarówno kwadruol jak i pułapka jonowa należą do analizatorów niskorozdzielczych. Natomiast analizatorami wysokorozdzielczymi, które zapewniają dokładny pomiar masy są TOF (rozdzielczość do 100 000), FT-ICR (5 000 000) oraz OrbiTrap (600 000), będący udoskonaleniem pułapki jonowej (Makarov i in., 2009). Analizatorem wykorzystywanym w MALDI jest najczęściej TOF. W analizatorze TOF stosunek m/z jonów jest określany poprzez pomiar czasu, jaki jest potrzebny jonom na pokonanie odcinka o znanej długości w celu dotarcia do detektora. Prędkość jonów jest zależna od stosunku m/z danego jonu. Wykorzystanie w technice MALDI dwóch analizatorów TOF (MALDI-TOF/TOF) lub hybrydy kwadruola i TOF (MALDI-qTOF) rozdzielonych komorą kolizyjną pozwala na wykonywanie fragmentacji wybranych jonów, co w przypadku analiz białek pozwala na sekwencjonowanie peptydów „*de novo*” (Krutchinsky i in., 2001; Yergey i in., 2002). Instrumenty te charakteryzują się wysoką czułością, rozdzielczością i dokładnością pomiaru masy. Połączenie kwadruola i analizatora czasu przelotu jest często spotykane w spektrometrach ze źródłem jonizacji typu ESI.

1.4.2.1. Strategie identyfikacji białek

Badania proteomu z wykorzystaniem spektrometrii mas jako techniki identyfikacji przeprowadzane są głównie za pomocą trzech podejść: strategii „bottom-up”, „shotgun” oraz „top-down” (ryc. 1.4).



Ryc. 1.4. Porównanie trzech głównych strategii identyfikacji białek (Sikorska i Rodziewicz, 2011).

Strategia "bottom-up" polega na analizie peptydów uzyskanych po trawieniu enzymatycznym na spektrometrze masowym i uzyskaniu identyfikacji danego białka. W tym podejściu do rozdzielenia mieszaniny białkowej najczęściej wykorzystuje się dwukierunkową elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone elektroforetycznie białka są następnie wycinane z żelu, oczyszczane z barwnika i poddawane reakcjom redukcji i alkilacji w celu zerwania występujących mostków siarczkowych i zabezpieczenia przed ich powstawaniem i sieciowaniem się peptydów. Następnie próbkę poddaje się trawieniu enzymatycznemu. Najczęściej wykorzystywaną proteazą jest trypsyna, która trawi specyficznie wiązania peptydowe po C-końcowej stronie lizyny i argininy, chyba, że następnym aminokwasem w sekwencji jest prolina, wówczas trawienie nie zachodzi. Innymi wykorzystywanymi enzymami są chymotrypsyna, która rozcina wiązania peptydowe po wystąpieniu hydrofobowych aminokwasów, a także endoproteinazy Lys-C czy Arg-C. Możliwe jest również zastosowanie bromocyjanu, który rozcina wiązania peptydowe po stronie karboksylowej metioniny (Matthiesen i Mutenda, 2007). Uzyskana mieszanina peptydów jest następnie analizowana metodami spektrometrii mas, najczęściej za pomocą aparatu MALDI-TOF (Hirano i in., 2004). W technice peptydowego odcisku palca (PMF, ang. *peptide mass*

fingerprinting) zakłada się, że każde białko poddane trawieniu wygeneruje unikalny zestaw peptydów, których zmierzone masy pozwolą na identyfikację białka. Mapa peptydowa służy do przeszukiwania baz danych i porównywania ich z teoretycznymi masami uzyskanymi przez trawienie *in silico* (Hjernø, 2007). Algorytmy za pomocą których przeszukiwane są bazy danych biorą pod uwagę różne parametry, m.in. typ i rozmiar bazy danych, taksonomię, enzym wykorzystany do trawienia białka, wprowadzone i opcjonalne modyfikacje w sekwencji aminokwasowej, tolerancję błędu zmierzonych mas (Sadygov i in., 2004). W strategii „bottom-up” możliwe jest również wykorzystanie tandemowego spektrometru masowego, który umożliwia fragmentację pojedynczych peptydów. Uzyskane widma MS/MS pozwalają na odczytanie częściowej sekwencji analizowanego białka i jego identyfikację w bazach danych. Przykładem takich spektrometrów jest MALDI-TOF/TOF lub sprzężony z chromatografią cieczową aparat pracujący ze źródłem ESI posiadający analizator tandemowy składający się np. z kwadrupola i analizatora czasu przelotu. W drugim przypadku mieszanina peptydów zostaje najpierw poddana rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (Stapels i Barofsky, 2004). Identyfikacja białek na spektrometrze MALDI-TOF jest najszybszą i najtańszą metodą identyfikacji białek. Zaletą PMF jest niewielka ilość próbki wymaga do pomiaru, a także możliwość jej przechowywania po analizie. Metoda ma również kilka ograniczeń. Jednym z nich jest słaba jonizacja niektórych peptydów, przez co nie są widoczne na widmie. Ponadto jeżeli trawieniu został poddany fragment żelu zawierający więcej niż jedno białko lub gdy występują dodatkowe sygnały pochodzące od peptydów posiadających modyfikacje lub/i zanieczyszczeń może to spowodować nieprawidłową lub brakiem identyfikacji białka (Cramer, 2009). Bazy danych wykorzystywane w proteomice opierają się na sekwencjach nukleotydowych. Gdy badany gatunek nie posiada zsekwencjonowanego genomu identyfikacja białek jest utrudniona i musi zostać przeprowadzona na podstawie homologii z innymi spokrewnionymi gatunkami. W przypadku posiadania danych MS/MS możliwe jest przeszukiwanie baz zawierających sekwencje ekspresyjne EST (Cottrell, 2011).

Proteomika typu „shotgun” obecnie zyskuje na popularności jako narzędzie wydajnej identyfikacji złożonych mieszanin białkowych. Termin ten został zapożyczony z sekwencjonowania „shotgun” genomowego DNA, gdzie długie sekwencje są składane z krótkich odczytów. W tym podejściu białka są identyfikowane na podstawie widm fragmentacyjnych peptydów (Yates, 2004). Typowa procedura eksperymentalna obejmuje przygotowanie próbek, wielowymiarową chromatografię cieczową, analizę spektrometryczną i identyfikację w bazach danych. Wyizolowana mieszanina białek jest poddawana

redukcji/alkilacji. W celu uproszczenia złożoności próbki białka mogą podlegać frakcjonowaniu technikami elektroforetycznymi lub chromatograficznymi (Rigaut i in., 1999) lub przez chemiczne znakowanie (Gygi i in., 1999). Kolejnym etapem jest enzymatyczne bądź chemiczne trawienie przygotowanych próbek. Proteoliza mieszaniny białek znacznie podwyższa złożoność próbki i z tego powodu, aby przeprowadzić wydajny rozdział powstałych peptydów konieczne jest zastosowanie przynajmniej dwóch wymiarów rozdziału chromatograficznego. Wielowymiarowa identyfikacja białek MudPIT (ang. *multidimensional protein identification technology*) jest podejściem analitycznym w chromatografii, w którym stosuje się dwie lub więcej faz stacjonarnych wykorzystujących różne właściwości fizykochemiczne białek do ich rozdziału. Możliwe jest zastosowanie sączenia molekularnego, chromatografii jonowymiennej, powinowactwa czy oddziaływań hydrofobowych. Najczęściej stosuje się jednak chromatograf wyposażony w kolumnę jonowymienną, która rozdziela peptydy zgodnie z ich ładunkiem (pierwszy kierunek) oraz kolumnę ze złożem odwróconym (RP-18, RP-4, ang. *reverse phase*) rozdzielającą peptydy pod względem ich hydrofobowości i oddziaływań ze złożem (drugi kierunek) (Swanson i Washburn, 2005). Strategia „shotgun” wymaga stosowania spektrometrów umożliwiających fragmentację rozdzielonych peptydów. Najczęściej stosowanymi analizatorami są potrójne kwadrupole (QqQ), pułapki jonowe, tandemowe czasu przelotu (TOF/TOF), a także hybrydy kwadrupola i czasu przelotu (qTOF) (Yates, 2004). Zaletą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) jest możliwość selekcji jonów o określonym stosunku m/z i poddania ich procesowi fragmentacji. W komorze kolizyjnej zjonizowany peptyd ulega indukowanej dysocjacji (CID, ang. *collision induced dissociation*). W wyniku zderzeń z cząsteczkami gazu szlachetnego następuje zerwanie wiązań pomiędzy aminokwasami i generowanie losowych, krótszych fragmentów. Suma wszystkich fragmentów składa się na widmo MS/MS, z którego możliwe jest odczytanie sekwencji peptydu. Zerwanie wiązań pomiędzy aminokwasami może nastąpić w różnych miejscach po stronie aminowej lub karboksylowej i prowadzi do powstania serii jonów określanych jako *abc*, jeżeli ładunek pozostaje na końcu aminowym oraz *xyz*, jeżeli jest on końcu karboksylowym (Roepstorff i Fohlman, 1984). 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*). Te metody umożliwiają fragmentację większych peptydów oraz określenie ich modyfikacji potranslacyjnych (Creese i Cooper, 2007; Syka i in., 2004). Standardowa analiza typu „shotgun” generuje od 10 000 do 100 000 widm MS/MS. Jednym z najbardziej obiecujących obszarów wykorzystania tej strategii jest analiza wielkoskalowa

modyfikacji potranslacyjnych, które za wyjątkiem glikozylacji, są trudne w obserwacji i dodatkowo zmieniają masę fragmentów peptydowych, co znacznie komplikuje proces identyfikacji. Przykładowo, wykorzystanie tej strategii pozwoliło na identyfikację 1000 fosfopeptydów i określenie 383 miejsc fosforylacji w drożdżach piekarniczych (*Saccharomyces cerevisie*) (Ficarro i in., 2002), a w korzeniu *Medicago truncatula* ponad 3000 ufosforylowanych peptydów (Grimsrud i in., 2010). W proteomice porównawczej strategia „shotgun” umożliwia wykorzystanie znakowania próbek. Do najpopularniejszych sposobów znakowania należą znaczniki izobaryczne iTRAQ (ang. *isobaric tag for relative and absolute quantitation*), które umożliwiają znakowanie i jednoczesny rozdział nawet 8 różnych próbek (Phanstiel i in., 2009), znaczniki ICAT (ang. *isotope-coded affinity tag*) (Gygi i in., 1999), które znakują tylko peptydy zawierające cysteinę oraz metoda SILAC (ang. *stable isotope labelling by amino acids in culture*), znajdująca zastosowanie w hodowlach komórkowych (Ong, 2002). Możliwa jest także analiza porównawcza bez znakowania, która jest realizowana poprzez monitorowanie zmian powierzchni pod pikiem chromatograficznym lub zliczanie widm MS/MS (Zhu i in., 2010).

Strategia „top-down” polega na fragmentacji całych białek na spektrometrze masowym, bez wcześniejszej obróbki enzymatycznej. Uzyskane widma masowe białka i jego fragmentów pozwalają na odczytanie sekwencji aminokwasowej, określenie rodzaju i miejsc identyfikacji potranslacyjnych. W proteomice „top-down” wykorzystuje się spektrometr masowy z analizatorem cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (FT-ICR), a także spektrometr z hybrydowym analizatorem pułapka jonowa – Orbitrap® (LTQ-Orbitrap). Wśród zalet tych spektrometrów należy wymienić bardzo wysoką dokładność pomiaru mas, czułość i rozdzielczość, które pozwalają na określenie składów elementarnych poszczególnych jonów dla białek o masach sięgających 70 kDa i rozróżnienie np. mostków siarczkowych ($\Delta m = 2$ Da), deaminacji ($\Delta = 1$ Da) czy trimetylacji i acetylacji ($\Delta m = 36$ mDa). W przypadku analizowania mieszaniny białkowej konieczne jest jej wcześniejsze frakcjonowanie. Rozdział białek może być przeprowadzony w połączeniu ze spektrometrem mas (on-line) lub też niezależnie on niego (off-line). Metodami wykorzystywanymi do rozdziału są chromatografia cieczowa, chromatografia cieczowa z odwróconą fazą, oddziaływań hydrofobowych, elektroforeza, ogniskowanie izoelektryczne (Catherman i in., 2014). Strategia „top-down” pozwala na 100% pokrycie sekwencji i identyfikację wariantów białek wynikających z zmienności genetycznej, alternatywnego „splicingu” i modyfikacji potranslacyjnych. Wadą tej techniki jest trudna interpretacja złożonych widm fragmentacyjnych (Smith i in., 2013).

1.4.3. Narzędzia bioinformatyczne i interpretacja wyników

Kluczowym aspektem badań proteomicznych jest identyfikacja białek i przypisanie im konkretnej funkcji biologicznej. Ten wymóg w dużej mierze spowodował rozwój nowych instrumentów badawczych, proteomicznych baz danych oraz narzędzi bioinformatycznych pozwalających na identyfikację białek, ustalanie sekwencji aminokwasowej, modyfikacji potranslacyjnych oraz analizę ilościową.

Do najpopularniejszych programów pozwalających na identyfikację białek w bazach danych za pomocą map peptydowych oraz widm MS/MS należą m.in. MASCOT (Perkins i in., 1999), ProFound (Zhang i Chait, 2000) czy SEQUEST (Eng i in., 1994). Lista dużej ilości programów komputerowych służącego do identyfikacji białek została opracowana w artykule przeglądowym autorstwa Birona i współpracowników (Biron i in., 2006). Oprogramowanie umożliwia porównanie i dopasowanie mas pików zmierzonych eksperymentalnie z masami teoretycznymi w bazach danych. Oprogramowanie pozwala także na wprowadzenie dodatkowych parametrów wyszukiwania potencjalnych białek w bazach danych. Oprócz wymaganej w odpowiednim formacie listy pików, możliwe jest określenie enzymu użytego do proteolizy, jego specyficzności, przewidywanych modyfikacji, masy molekularnej, punktu izoelektrycznego, badanego organizmu, zakresu tolerancji mas, baz danych oraz typu użytego spektrometru do wygenerowania widma.

Każdy z programów posiada inny algorytm identyfikacji białek (Sadygov i in., 2004). Algorytmy wykorzystywane do identyfikacji białek początkowo opierały się jedynie na liczbie trafień pomiędzy pikami eksperymentalnymi i teoretycznymi, ale działały prawidłowo tylko dla dobrych jakościowo danych, a także dodatkowo lepiej „punktowały” większe białka. W późniejszych algorytmach wzięto także pod uwagę dodatkowe informacje, jak masa cząsteczkowa białka.

Jednym z bardziej zaawansowanych algorytmów służących identyfikacji białek jest MOWSE (ang. *molecular weight search*), zaimplementowany m.in. w silniku MASCOT. W tym algorytmie wzięto pod uwagę względną intensywność jonów poszczególnych peptydów na widmie, dzięki czemu przypadkowe dopasowania do większych białek występują z niższą częstotliwością (Pappin i in., 1993). W silniku wyszukiwania MASCOT wykorzystano także inny algorytm, w którym obliczane jest prawdopodobieństwo, że dopasowanie danych eksperymentalnych do teoretycznych stanowi zdarzenie losowe. Białka są następnie ustawiane w kolejności zgodnie ze wzrastającym prawdopodobieństwem przypadkowej identyfikacji (Perkins i in., 1999). Wynikiem przeszukiwania baz danych

w przypadku korzystania z silnika wyszukiwania MASCOT jest ilość przyznanych punktów przez algorytm MOWSE, wartość p (ang. *p-value*), procent pokrycia dopasowanej sekwencji oraz różnica mas pomiędzy peptydami zmierzonymi eksperymentalnie i teoretycznymi (Δppm). Wartości tych parametrów określają pewność z jaką można stwierdzić czy dane białko zostało zidentyfikowane prawidłowo czy nie. Niestety zdarzają się również przypadki wyników fałszywie prawdziwych, dlatego konieczna jest dodatkowa staranna interpretacja otrzymanego wyniku (Nawrot i in., 2013).

Identyfikacja białek na podstawie widm fragmentacyjnych może się odbywać poprzez przeszukiwanie baz danych lub sekwencjonowanie „*de novo*” polegającym na ustalaniu sekwencji aminokwasowej wybranych peptydów. Oba podejścia, tzn. peptydowy odcisk palca i widma MS/MS, mogą być łączone w celu podwyższenia liczby identyfikacji. Jednym z pierwszych programów umożliwiających analizę dużej liczby widm fragmentacyjnych był program SEQUEST, w którym w pierwszym etapie następuje wybranie jonu, który następnie ulega fragmentacji. Za pomocą programu, wyszukuje się wszystkie sekwencje o takiej samej masie jak wybrany jon. Wybrane sekwencje podlegają teoretycznej fragmentacji i porównaniu z rzeczywistym widmem fragmentacyjnym (Eng i in., 1994). Nowszym narzędziem służącym interpretacji widm MS/MS jest silnik Sonar MS/MS, w którym identyfikacja jest niezależna od podania dokładnej masy jonu peptydu, podlegającemu fragmentacji i pozwala na identyfikację białek posiadających modyfikacje (Field i in., 2002). Dostępnych jest również wiele narzędzi bioinformatycznych umożliwiających sekwencjonowanie „*de novo*” peptydów (Ma i Johnson, 2012) oraz integrujących to podejście z przeszukiwaniem baz danych, np. PEAK DB (Zhang i in., 2012).

Rozwój baz z dostępnymi sekwencjami białkowymi stał się możliwy dzięki postępowi jaki się dokonał w bioinformatyce i aparaturze badawczej, umożliwiającej przeprowadzanie wielkoskalowych eksperymentów. Do dwóch największych baz proteomicznych umożliwiających przeszukiwanie danymi uzyskanymi podczas analiz spektrometrycznych należą baza SwissProt, utrzymywana przez Europejski Instytut Bioinformatyki (Boeckmann i in., 2003) oraz amerykańska baza NCBI (ang. *National Center for Biotechnology and Information*). W bazie SwissProt wszystkie znane warianty danego białka są utrzymywane jako jeden wpis (rekord), dzięki czemu jej rozmiar jest relatywnie mały, a czas potrzebny do przeszukiwania niewielki. Jednakże, jeżeli białko jest reprezentowane przez jeden czy dwa piki na widmie MS/MS, istnieje duże ryzyko, że nie zostanie zidentyfikowane w takiej bazie. Alternatywą jest baza NCBI, w której sekwencja aminokwasowa każdej izoformy danego białka jest osobnym wpisem, co jednak wpływa na powiększenie rozmiaru bazy i znaczne

wydłużenie czasu potrzebnego do jej przeszukiwania (ok. 20-krotnie w porównaniu z wyszukiwaniem w bazie SwissProt) (Pruitt i in., 2007). Gdy badany gatunek nie jest dobrze reprezentowany w bazach proteomicznych możliwe jest wykorzystanie baz zawierających sekwencje nukleotydowe, np. bazy zawierające krótkie sekwencje kodujące, które są jednak duże i bardzo nadmiarowe. Ponadto wymagają posiadania wysokiej jakości widm. Wykorzystywane są także bazy genomowe, jednakże identyfikacja białka w takiej bazie może być utrudniona z tego względu, że w rekordzie danego genu zapisane są także sekwencje intronów, jeżeli badany gatunek należy do organizmów wyższych (Choudhary i in., 2001). Istnieją również bazy danych opracowane dla konkretnych gatunków. Duża część z nich została stworzona dla roślin modelowych, zarówno dwuliściennych jak rzodkiewnik pospolity np. AtProteome (Baerenfaller i in., 2008), ProMEX (Hummel i in., 2007), SUBA (Heazlewood i in., 2007), jak i jednoliściennych, np. ryżu: OryzaPG-DB (Helmy i in., 2011). Innym przykładem jest baza PPDB, która zawiera informacje na temat białek rzodkiewnika i kukurydzy z różnych organów i lokalizacji subkomórkowych (Sun i in., 2009). 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).

1.4.4. Eksploracja danych proteomicznych

Badania porównawcze w proteomice, w której identyfikuje się różnice występujące pomiędzy dwoma lub więcej stanami komórkowymi zarówno pod względem jakościowym i ilościowym, stanowią najczęściej wykorzystywaną poddziedzinę tej dyscypliny. Niezależnie od zastosowanego podejścia analitycznego ilość generowanych danych jest ogromna i zwiększa się wraz z liczbą badanych obiektów, punktów czasowych i warunków (stanów biologicznych), a także wraz ze wzrostem czułości i rozdzielczości dostępnej aparatury badawczej. Analizę dużej ilości danych proteomicznych można porównać do szukania igły w stogu siana.

Główną trudnością w analizie danych uzyskanych po dwukierunkowym rozdziale elektroforetycznym jest duża liczba zmiennych, czyli względna intensywność rozdzielonych białek, których ilość może sięgać nawet kilku tysięcy, w porównaniu z niewielką ilością powtórzeń biologicznych i technicznych, co może być powodem niewystarczającej jakości

uzyskanych danych z punktu widzenia obliczeń statystycznych. Ponadto profile akumulacji białek są często niekompletne z powodu rzeczywistego braku plamki na żelu lub nieprawidłowego ich dopasowania pomiędzy żelami powstałego na skutek np. błędów technicznych (Biron i in., 2006).

Jednym z celów eksploracji danych proteomicznych jest analiza akumulacji białek w dwóch lub więcej stanach biologicznych, aby spośród tysięcy rozdzielonych białek wyselekcjonować kilka o największym znaczeniu dla postawionego pytania biologicznego. Obecne oprogramowanie dedykowane do analizy żeli wykorzystuje jedynie podstawowe metody statystyczne takie jak test t-Studenta czy nieparametryczny test Manna-Whitneya. W teście t-Studenta testuje się hipotezę zerową, że średnie dwóch populacji o rozkładzie normalnym są równe, ale tylko pomiędzy dwoma warunkami biologicznymi. Z kolei jednowymiarowa analiza wariancji (ANOVA, ang. *analysis of variance*) umożliwia porównanie trzech i więcej średnich, jednakże nie pozwala na wykrycie trendów oraz grup białek podobnie reagujących na dany czynnik (Biron i in., 2006).

Wielowymiarowe metody analizy statystycznej znajdują zastosowanie wówczas, gdy istnieje więcej niż jeden czynnik wpływający na populację, np. większa liczba traktowań czy różne genotypy. Analizy wielowymiarowe pozwalają na redukcję złożoności danych (ich wymiarowości) do możliwego minimum poprzez kondensację zmienności próbki do mniejszej liczby elementów. Te zaawansowane metody statystyczne umożliwiają określenie wpływu każdego czynnika na populację (efekt główny) oraz ustalenie interakcji pomiędzy poszczególnymi czynnikami. Do najczęściej wykorzystywanych metod wielowymiarowej analizy należą: analiza składowych głównych (PCA, ang. *principal component analysis*), w której są generowane niezależne od siebie składowe główne, będące kombinacją liniową badanych zmiennych. Pierwszą składową główną jest ta, która wyjaśnia większość zmienności danych. Wykres PCA pozwala na zobrazowanie struktury danych, dzięki czemu możliwe jest zidentyfikowanie grup i odstających składowych głównych. Ich wnikliwa analiza pozwala dotrzeć do zmiennych początkowych, które mają duży wpływ na poszczególne składowe główne i na tej podstawie wyciągnięcie wniosków biologicznych (Dowsey i in., 2003). Inną metodą wielowymiarowej analizy statystycznej jest analiza składowych niezależnych (ICA, ang. *independent component analysis*), która, w przeciwieństwie do PCA, polega na rozłożeniu danych wejściowych na składowe niezależne. Ta metoda pozwala na redukcję szumu (tła) i zmniejszenie liczby artefaktów. W bezpośrednim porównaniu użyteczności metod ICA i ANOVA w analizie żeli dwukierunkowych, dla idealnie dopasowanych żeli, obie metody dały porównywalne wyniki.

Natomiast, gdy zostały wprowadzone niewłaściwe dopasowania plamek pomiędzy żelami, analiza składowych niezależnych pozwoliła na otrzymanie lepszych rezultatów niż analiza wariancji. Metoda ICA ma większą moc statystyczną niż PCA oraz jest szybsza niż ANOVA, jednakże jest to technika eksploracyjna, umożliwiającą jedynie szybkie przeszukiwanie plamek w sposób automatyczny i jej wykorzystanie w analizie dużych ilości danych proteomicznych wymaga dalszych badań (Safavi i in., 2008). Klasyfikacja czy grupowanie dużych ilości białek zgodnie z ich profilem akumulacji mogą być także wykonane za pomocą grupowania hierarchicznego (HCA, ang. *hierarchical clustering analysis*). HCA jest techniką pozwalającą na wizualizację dużych ilości danych i jest powszechnie wykorzystywana w analizie mikromacierzy, jednakże z powodzeniem może zostać wykorzystana w analizie danych proteomicznych (Meunier i in., 2007). Analiza HCA polega na obliczeniu dystansu pomiędzy elementami i utworzeniu dendrogramu przez algorytm grupujący, w którym najbliższe obiekty są do siebie matematycznie najbardziej podobne. Obliczenie odległości za pomocą współczynnika korelacji Pearsona w połączeniu z metodą grupowania Warda lub odległości euklidesowej z metodą średnich odległości między obiektami w skupieniach (UPGMA, ang. *unweighted paired group average linkage*) są najczęściej stosowane w klasteryzacji danych proteomicznych (Meunier i in., 2007). Analiza HCA danych proteomicznych może zostać przeprowadzona za pomocą oprogramowania zaprojektowanego do analizy transkryptomu, np. PermutMatrix (Caraux i Pinloche, 2005) czy Cluster+TreeView (Eisen i in., 1998). Programy te umożliwiają także obrazowanie wyników za pomocą map cieplnych, czyli kolorowej interpretacji profili akumulacji, w których odcień danego koloru jest proporcjonalny do wartości danego punktu. Mapy cieplne, zorganizowane w formie macierzy, są skuteczną metodą wizualizacji dużych ilości złożonych danych. W typowej mapie cieplnej dane są przedstawione w taki sposób, że w każdej kolumnie znajdują się wartości uzyskane z pojedynczej próbki, a w wierszach występuje jakaś cecha. W przypadku analizy danych proteomicznych jest to konkretne białko. Mapa cieplna w połączeniu z klasteryzacją hierarchiczną pozwala na pogrupowanie podobnych profili blisko siebie oraz znalezienie różnic i podobieństw w akumulacji pomiędzy grupami białek i jednocześnie pomiędzy próbkami biologicznymi (Key, 2012). Kombinacja analiz jednowymiarowych i wielowymiarowych dostarcza kompleksowego przeglądu danych na temat pojedynczych białek oraz istniejących trendów i interakcji jakie zachodzą pomiędzy nimi na przestrzeni badanych obiektów i jest niezwykle przydatna w selekcji białek, które mogą stanowić potencjalne markery związane z odpornością na dany stres.

1.4.5. Wykorzystanie proteomiki w poszukiwaniu biomarkerów odporności na suszę

Proteomika stała się użytecznym narzędziem wykorzystywanym w studiowaniu odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe. Zwłaszcza analizy porównawcze dają duży wgląd w zmiany zachodzące w proteomie w wyniku reakcji na dany czynnik. Celem badań proteomicznych roślin poddanych na suszę oprócz analizy profilu akumulacji białek jest także próba identyfikacji białek-markerów związanych z odpornością na ten stres. Wiedza na temat białek zaangażowanych w kluczowe procesy zaangażowane w odpowiedź na suszę oraz poprawna interpretacja uzyskanych wyników umożliwia identyfikację potencjalnych markerów związanych z odpornością na niedobór wody, które następnie mogą zostać wykorzystane w hodowli nowych odmian jako narzędzie selekcji genotypów odpornych. Geny kodujące białka-markery mogą stanowić także podstawę polepszania cech użytkowych roślin metodami inżynierii genetycznej.

Badania na poziomie białek z powodzeniem zostały wykorzystane w analizie skutków suszy u wielu gatunków roślin, w tym także roślin zbożowych jak pszenica (Caruso i in., 2009), ryż (Salekdeh i in., 2002), jęczmień (Kausar i in., 2013) czy kukurydza (Riccardi i in., 2004). Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na identyfikację wielu białek zaangażowanych w odpowiedź rośliny na suszę, m.in. białek zaangażowanych w mechanizmy obronne, detoksykację, regulację potencjału redoks komórki, ekspresją genów, a także białek związanych z fotosyntezą, metabolizmem pierwotnym i wtórnym (Kosová i in., 2011; Rodziewicz i in., 2014).

Poszukiwanie biomarkerów białkowych rozpoczyna się zwykle od eksperymentów, w których wykorzystuje się rośliny posiadające kontrastujące genotypy, np. wrażliwe i odporne na suszę, często pochodzące z różnych rejonów świata, w celu identyfikacji nie tylko różnic w profilu akumulacji białek pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz poddanych suszy, ale także zmian proteomu pomiędzy odmianami. Analiza siewek jęczmienia poddanych suszy wykazała istnienie znacznych różnic w profilach białkowych pomiędzy genotypami wrażliwymi i tolerancyjnymi na ten stres. Białka związane z metabolizmem pierwotnym, fotosyntezą i mechanizmami obronnymi ulegały spadkowi w profilu akumulacji w genotypie wrażliwym, podczas gdy w tolerancyjnym obserwowany był wzrost ich akumulacji, co może świadczyć o ich roli w adaptacji roślin do warunków niedoboru wody (Kausar i in., 2013). Różnice w profilu akumulacji białek pomiędzy odmianą tolerancyjną i wrażliwą na suszę były również obserwowane w pszenicy. W odpowiedzi na kwas

abscysynowy w genotypie odpornym większa liczba białek uległa zmianie w poziomie akumulacji w porównaniu do genotypu wrażliwego. Dodatkowo, ponad 4 razy więcej białek wykazywało wzrost w profilu akumulacji w odmianie odpornej (133 do 33). W korzeniach odmiany tolerancyjnej białka szoku cieplnego (HSP70, HSP90) wykazywały większy wzrost poziomu akumulacji niż w odmianie wrażliwej. Białka związane z przekazywaniem sygnałów jak kinazy zależne od wapnia, kinazy aktywowane mitogenami, fosfatazy, homologi białek 14-3-3, a także białka zaangażowane w metabolizm wtórny flawonoidów, giberelin, fitoaleksyn, podlegały wzrostowi w poziomie akumulacji w odmianie odpornej, podczas gdy w odmianie wrażliwej obserwowano spadek ich ilości, a także białek zaangażowanych w syntezę lignin i ściany komórkowej, co może świadczyć o istnieniu różnic w jej budowie pomiędzy odmianami i znaczeniu w tolerowaniu suszy (Alvarez i in., 2014). W ziarniakach trzech odmian pszenicy, jednej odpornej i dwóch wrażliwych na suszę, zidentyfikowano kilka białek kluczowych w odpowiedzi na ten stres. Dwa białka: tioredoksyna h oraz S-transferaza glutationowa zwiększyły znacznie poziom swojej akumulacji w suszy w genotypie odpornym podczas gdy ich poziom zmniejszył się w obu genotypach wrażliwych. Wyniki te sugerują pełnienie istotnej roli przez białka zaangażowane w regulowaniu potencjału redoks komórki w kontekście tolerancji na suszę (Hajheidari i in., 2007). Ponadto duża liczba białek zidentyfikowanych w analizie skutków suszy w warunkach polowych w liściach dwóch odmian buraka cukrowego była związana z metabolizmem wolnych rodników, co podkreśla znaczenie zarządzania stresem oksydacyjnym w suszy dla poprawnego funkcjonowania roślin. Inne białka, które zidentyfikowano były związane z fałdowaniem i stabilnością białek (Hajheidari i in., 2005).

Geny kodujące białka, które odgrywają kluczowe role w odpowiedzi na suszę oraz w sposób wyraźny różnicujące genotypy tolerancyjne i wrażliwe często stanowią przedmiot dalszych badań nad ich wpływem na poziom tolerancji na niedobór wody. Duży nacisk kładzie się zwłaszcza na inżynierię genów kodujących białka szoku cieplnego, białka późnej embriogenezy, enzymy zaangażowane w usuwanie wolnych rodników, białka uczestniczące w syntezę związków kompatybilnych, a także regulatorów wzrostu i czynników transkrypcyjnych. Białka szoku cieplnego na ogół są powszechnie identyfikowane w badaniach proteomicznych nad wpływem suszy na rośliny i bardzo często ulegają podwyższonej akumulacji w warunkach stresów abiotycznych (Wang i in., 2004). Przykładowo, poziom akumulacji HSP70 ulegał wzrostowi tylko w odmianie tolerancyjnej siewek jęczmienia w warunkach suszy (Ashoub i in., 2013). Rośliny tytoniu z nadekspresją genu *nthsp70-1* wykazywały zwiększoną tolerancję na niedobór wody (Cho i Hong, 2006).

Białka HSP70 były także przedmiotem oceny ich przydatności jako biomarkery stresu osmotycznego i temperaturowego (Ireland i in., 2004).

Inżynieria genów biorących udział w szlakach syntezy związków kompatybilnych często prowadzi do uzyskania roślin o zwiększonej tolerancji na deficyt wody. W transgenicznym tytoniu o podwyższonej ekspresji genu kodującego monooksygenazę choliny (Shen i in., 2002) oraz pszenicy z nadekspresją dehydrogenazy aldehydu betainy (Wang i in., 2010), kluczowych enzymów syntezy betainy glicynowej obserwowano zwiększoną zawartość tego związku, a także wzrost poziomu tolerancji na niedobór wody. Nadekspresja syntetazy 1-pirolino-5-karboksylanu, enzymu szlaku syntetycznego proliny, m.in. w soi (De Ronde i in., 2004) i tytoniu (Kavi Kishor i in., 1995) również spowodowała wzrost tolerancji na suszę i podwyższenie zawartości tego związku w tkankach, podobnie jak inżynieria genów szlaku biosyntezy trehalozy (Abebe, 2003; Garg i in., 2002).

Modyfikacje genów kodujących enzymy stanowiące składniki systemów neutralizowania wolnych rodników również przyczyniają się do podwyższenia tolerancji na niedobór wody (Pastori i Foyer, 2002). Zwiększenie ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy monodehydroaskorbinianu powoduje zwykle podwyższenie tolerancji na różne stresy abiotyczne, w tym suszę (Wang i in., 2003). Białka późnej embriogenezy akumulują się w suszy i odgrywają znaczące funkcje w ochronie roślin przed skutkami niedoboru wody (Hong-Bo i in., 2005).

Różnice ilościowe w ekspresji genów białek późnej embriogenezy i zmian w profilu akumulacji białek były badane w wielu gatunkach roślin. Chociaż mechanizm ich działania nie został do końca poznany, przypuszcza się, że stanowią one białka opiekuńcze zaangażowane w utrzymywanie stabilności błony komórkowej i homeostazy jonowej (Chandra Babu i in., 2004). W analizie siedmiu odmian pszenicy znaleziono związek pomiędzy wzrostem akumulacji dehydryn – jednej z rodzin białek późnej embriogenezy, a niedoborem wody. W trzech odmianach obserwowano znaczny wzrost akumulacji tych białek, podczas gdy w roślinach kontrolnych w ogóle ich nie wykryto. Odmiany ze zwiększonym poziomem akumulacji dehydryn charakteryzowały się lepszym wzrostem, co mogło być związane z lepszym tolerowaniem suszy (Lopez i in., 2003). Zarówno w siewkach jęczmienia jak i dojrzałych roślinach poddanych działaniu suszy, zwiększona akumulacja transkryptów dwóch genów kodujących dehydryny *dhn3* i *dhn4* była obserwowana tylko w odmianach tolerancyjnych. Ponadto wzrost ilości ich transkryptu został skorelowany z takimi parametrami jak względna zawartość wody oraz indeks pogodowy plonu (Park i in.,

2006). Transgeniczna pszenica posiadająca gen *hva1*, kodujący białko późnej embriogenezy z jęczmienia, wykazywała zwiększoną tolerancję na suszę oraz efektywniej wykorzystywała dostępną wodę, co przełożyło się na większy przyrost biomasy (Sivamani i in., 2000). Transgeniczny ryż wykazujący konstytutywną ekspresję genu *oslea3-1* również charakteryzował się zwiększoną tolerancję na suszę, nawet w warunkach polowych (Xiao i in., 2007).

Poszukiwanie markerów na poziomie proteomu jest utrudnione przez jego dużą zmienność, co jednocześnie jest powodem wielu rozbieżności w uzyskiwanych rezultatach w różnych laboratoriach. W pracach eksperymentalnych opisujących skutki suszy na poziomie proteomu najczęściej analizowane są kontrastujące ze sobą genotypy pod względem tolerancji na ten stres, ale tylko ich niewielka liczba jest badana. Kombinacja małej liczby analizowanych obiektów i wspomnianej wyżej zmienności proteomu powoduje, że trudno jest jednoznacznie określić, które z białek o zmienionym profilu akumulacji są związane z tolerancją na suszę, a które są jedynie wskaźnikiem wystąpienia niedoboru wody.

Inżynieria genetyczna kluczowych genów białek, dla których odkryto w większym lub mniejszym stopniu związek z tolerancją na suszę, często prowadzi do uzyskania roślin o zwiększonej odporności na niedobór wody. Z drugiej strony częstym problemem roślin modyfikowanych genetycznie są zaburzenia we wzroście i rozwoju oraz niskie plonowanie (Cho i Hong, 2006; Kasuga i in., 1999). Dodatkową trudnością w poszukiwaniu białek związanych z odpornością na suszę, jest fakt, że analizy, za wyjątkiem kilku przypadków, są przeprowadzane wyłącznie w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Wyniki takich badań, mogą nie odzwierciedlać procesów zachodzących w środowisku naturalnym, a same rośliny, uznane za tolerancyjne niekoniecznie będą charakteryzowały się lepszymi parametrami wzrostowymi i plonem w warunkach polowych.

1.5. Strategie hodowli roślin odpornych na suszę

W celu sprostania rosnącemu zapotrzebowaniu na żywność i pogarszającym się warunkom wodno-klimatycznym konieczne jest stworzenie nowych odmian, które będą odporne na stresy abiotyczne, a zwłaszcza suszę. Na przestrzeni ostatniego wieku nastąpił ogromny postęp w uzyskiwaniu nowych odmian roślin uprawnych o pożądanym cechach,

spowodowany rozwinięciem klasycznych metod hodowli oraz metod opartych na technikach biologii molekularnej i biotechnologii.

W metodach klasycznych zmienność genetyczna w kierunku uzyskania odporności na suszę może zostać zidentyfikowana poprzez przeszukiwanie banków zasobów genowych (banków plazmy zarodkowej) danego gatunku lub gatunków zgodnych płciowo. Korzystne cechy są wprowadzane do nowych linii genetycznych poprzez różne kombinacje krzyżowania roślin i następnie selekcję potomstwa na podstawie ich fenotypu. W latach 70-tych ubiegłego stulecia w Meksyku oraz Ganie poprzez rozmnażanie i selekcję uzyskano odporne na suszę hybrydy kukurydzy, które również charakteryzowały się lepszym plonem w warunkach niedoboru wody (Bänziger i in., 2004). Jeżeli zmienność genetyczna w obrębie danego gatunku jest niewystarczająca wówczas można wykorzystać do krzyżowania dzikich przodków roślin uprawnych, które stanowią cenne źródło alleli odporności na suszę (Nevo i Chen, 2010). Skrzyżowanie dzikiego przodka, diploidalnego egilopsa (*Aegilops tauschii* L.) z tetraploidalną pszenicą szorstką (*Triticum turgidum* var. *durum*) znacznie powiększyło zmienność genetyczną w kierunku odporności na różne stresy biotyczne i abiotyczne oraz dało początek heksaploidalnej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zawierającej genom D z *A. tauschii* (Villareal i in., 1994). Hodowcy z ICARDA (ang. *International Center for Agricultural Research in Dry Areas*) poprzez skrzyżowanie linii hodowlanej jęczmienia z jego dzikim przodkiem (*Hordeum spontaneum*) uzyskali nową odmianę charakteryzującą się bardzo dużą odpornością na suszę oraz wysokim, stabilnym plonem w warunkach niedoboru wody (ICARDA News). Klasyczna hodowla roślin odpornych na suszę przyczyniła się do uzyskania wielu nowych odmian m.in. ciecierzycy, fasoli, orzecha ziemnego czy soi (Ashraf, 2010), jednakże jest to metoda czaso- i pracochłonna, a także droga. Problemem jest także selekcja pożądanych genotypów, ponieważ wraz z korzystnymi cechami wprowadzane są cechy niepożądane. Uzyskanie nowych odmian o lepszych właściwościach wymaga przeprowadzenia wielu cykli rozmnażania i selekcji. Ulepszanie cech roślin uprawnych metodami klasycznej hodowli jest możliwe tylko wtedy, gdy dysponuje się dużą zmiennością genetyczną.

Postęp w dyscyplinach zintegrowanych w biologię systemów oraz technikach wykorzystywanych w biologii molekularnej umożliwił rozwój biotechnologicznych podejść uzyskiwania nowych odmian. Hodowla wspomagana markerami (MAB, ang. *marker-assisted breeding*) jest techniką łączącą tradycyjną hodowlę z markerami DNA i pozwala na wydajniejszą selekcję odmian oraz skrócenie liczby cykli hodowlanych (Ashraf, 2010; Tuberosa i Salvi, 2006). W tej technice przeszukiwanych jest bardzo wiele rejonów genomu

w celu zidentyfikowania takich miejsc na chromosomach, których zmienność alleliczna może być statystycznie powiązana z cechą ilościową, na której fenotypową wartość mają wpływ liczne geny i oddziaływanie środowiska. Są one określane jako locus cechy ilościowej (QTL, ang. *quantitative trait locus*) (Tuberosa i Salvi, 2006). Identyfikacja markerów QTL pozwala na ocenę miejsca, liczby i wielkości nasilenia efektu fenotypowego. Ułatwiła wnikliwą analizę złożonych cech kontrolowanych poligenowo odpowiadających np. za mechanizmy regulujące odpowiedź na suszę. Identyfikacja markerów QTL wymaga ewaluacji fenotypowej dużej liczby roślin tworzących populację mapującą. Następnie część tej populacji podlega genotypowaniu. Wykorzystując odpowiednie metody statystyczne możliwa jest identyfikacja konkretnych *loci* kontrolujących daną cechę (Asíns, 2002). Populację mapującą stanowi określona liczba genotypów (100 i więcej) będących krzyżówką jednego gatunku lub gatunków spokrewnionych. Cecha, która jest badana musi być polimorficzna pomiędzy genotypami rodzicielskimi, a poziom jej dziedziczenia wysoki w obrębie populacji. Cztery typy populacji są wykorzystywane do identyfikacji markerów QTL i konstruowania map genetycznych: populacja składająca się z pokolenia F₂, populacja utworzona przez krzyżowanie wsteczne, podwójnych haploidów i rekombinacyjne linie wsobne (Hussain, 2006). Wykorzystanie markerów QTL w hodowli wspomaganey markerami pozwala na kumulowanie pożądaných alleli konkretnych genów lub/i obszarów chromosomu (markerów QTL) w jedno tło genetyczne. Mapowanie markerami QTL w kierunku tolerancji na suszę zostało przeprowadzone dla wielu roślin uprawnych, m.in. dla kukurydzy (Sari-Gorla i in., 1999), pszenicy (Quarrie i in., 1994), jęczmienia (Teulat i in., 1997) czy ryżu (Bernier i in., 2007). Przykładowo, wykorzystując populację mapującą jęczmienia, składającą się ze 187 rekombinacyjnych linii wsobnych, zidentyfikowano markery QTL związane ze wzrostem, liczbą łodyg i względną zawartością wody. Ustalono, że w warunkach niedoboru wody za zmiany względnej zawartości wody i liczby łodyg był głównie odpowiedzialny jeden region na pierwszym chromosomie. Wiele oddziaływań epistatycznych pomiędzy markerami QTL było obserwowanych tylko w suszy, co sugeruje, że niektóre regiony chromosomów kontrolują ekspresję określonych cech wyłącznie w warunkach niedoboru wody (Teulat i in., 1997).

Nowe technologie stosowane w genomice, jak np. sekwencjonowanie nowej generacji (Mardis, 2008) oraz narzędzia bioinformatyczne znacznie przyspieszają identyfikację nowych markerów, które mogą zostać wykorzystane w programach hodowlanych zmierzających do uzyskania roślin odpornych na niedobór wody. Mapowanie markerami QTL jest skuteczną metodą oceny tolerancji na stres i wciąż zyskuje na popularności o czym świadczy rosnąca

liczba badań nad ich identyfikacją. Mapowanie markerami może być rozszerzone o markery metaboliczne (mQTL, ang. *metabolic QTL*) (Fernie i Schauer, 2009) czy proteomiczne (pQTL, ang. *proteomic QTL*) (de Vienne i in., 2001). Ze względu na złożoność genomu i licznosc oddziaływań pomiędzy poszczególnymi czynnikami genetycznymi oraz środowiskiem w wielu przypadkach liczba stabilnych markerów QTL, które mogą być wykorzystane w hodowli jest mniejsza niż zidentyfikowana w konkretnej populacji mapującej w określonych warunkach środowiska. Stanowi to jeden z powodów, dla których wykorzystanie tej techniki w tworzeniu nowych odmian odpornych na suszę ma wciąż niewielkie znaczenie (Ashraf, 2010).

Innym podejściem, które jest wykorzystywane w uzyskiwaniu odmian o podwyższonej tolerancji na suszę jest inżynieria genetyczna, które może być realizowane głównie na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest podwyższenie lub obniżenie ekspresji genów kodujących białka związane z odpowiedzią na suszę, jednakże modyfikacja pojedynczych genów nie zawsze daje zamierzone rezultaty. Druga strategia polega na manipulacji ekspresją genów regulatorowych, np. czynników transkrypcyjnych (Ashraf, 2010; Reguera i in., 2012). Nadekspresja czynników DREB, które odgrywają znaczącą rolę w regulowaniu ekspresji genów w suszy, zwykle prowadzi do zwiększenia tolerancji na ten stres (Lata i Prasad, 2011). Wprowadzenie genu z laseczki siennej (*Bacillus subtilis*) do odmian kukurydzy, które zostały przystosowane do wzrostu w warunkach ograniczonej dostępności wody metodami hodowli konwencjonalnej, spowodowało podwyższenie tolerancji na suszę oraz zwiększenie plonowania w tych warunkach (Castiglioni i in., 2008). Wykorzystanie biotechnologicznych metod hodowli pozwoliło na uzyskanie wielu nowych odmian o podwyższonej odporności na suszę, a także inne stresy abiotyczne, jednakże głównym problemem w ich komercjalizacji jest to, że zazwyczaj są one testowane wyłącznie w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, często bez uwzględnienia wysokości i stabilności plonu, który jest kluczowym parametrem determinującym przydatność danej odmiany do uprawy (Ashraf, 2010; Cominelli i in., 2013).

2. CEL PRACY

Celem badań była analiza proteomiczna siewek liści jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) wzrastającego w warunkach niedoboru wody i wyselekcjonowanie białek różnicujących badane genotypy w suszy, które mogą stanowić potencjalne markery związane z odpornością na ten stres.

Badania zostały przeprowadzone na formach rodzicielskich Maresi (odmiana niemiecka) i Cam/B1//CI08887//CI05761 (linia hodowlana, syryjska) oraz 100 rekombinacyjnych liniach wsobnych (F₈) populacji mapującej utworzonej z tych genotypów, a także na dwóch odmianach referencyjnych: Sebastian i Stratus.

Realizowane badania stanowią jedno z zadań projektu POLAPGEN-BD, którego nadrzędnym celem jest opracowanie narzędzi biotechnologicznych służących do selekcji odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę.

Wyselekcjonowane białka, których profil akumulacji uległ zmianie w roślinach poddanych działaniu suszy zostaną skorelowane z danymi uzyskanymi w pozostałych zadaniach projektu, dotyczących m.in. analiz genomu, transkryptomu i metabolomu, a także z cechami morfologicznymi i anatomicznymi roślin oraz dotyczącymi właściwości uzyskanego plonu. Pomyślna integracja danych proteomicznych pozwoli na identyfikację białek-markerów, związanych z odpornością na niedobór wody.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Odczynniki

Odczynniki stosowane podczas ekstrakcji białek:

- chlorek potasu; Bioshop (Kanada)
- sacharoza; Bioshop (Kanada)
- tri(hydroksymetylo)aminometan (TRIS); Bioshop (Kanada)
- wersenian disodowy (EDTA); Bioshop (Kanada)
- fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF); Bioshop (Kanada)
- etanol; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)
- fenol; Bioshop (Kanada)
- 8-hydroksychinolina; Sigma-Aldrich (Niemcy)
- mieszanina inhibitorów proteaz; GE Healthcare Life Sciences (USA)

Odczynniki stosowane do strącania białek:

- octan amonu; Bioshop (Kanada)
- metanol; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)

Odczynniki stosowane do oczyszczania białek:

- octan amonu; Bioshop (Kanada)
- metanol; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)
- poliwinylpirolidon; Sigma-Aldrich (Niemcy)

Odczynniki stosowane do rozdzielania białek w pierwszym kierunku elektroforezy dwukierunkowej:

- mocznik; Bioshop (Kanada)
- tiomocznik; Bioshop (Kanada)
- 3- [(3-cholamidopropyl)-dimetyloamonio]-propano-sulfonian (CHAPS); Bioshop (Kanada)
- zestaw do mierzenia stężenia białka (2D Quant Kit); GE Healthcare Life Sciences (USA)
- ditiotretitol (DTT); Bioshop (Kanada)
- mieszanina amfolitów o zakresie pH 4-7 (IPG Buffer); GE Healthcare Life Sciences (USA)
- błękit bromofenolowy; Bioshop (Kanada)
- TRIS; Bioshop (Kanada)
- glicyna; Bioshop (Kanada)
- dodecylsulfian sodu (SDS); Bioshop (Kanada)
- paski żelowe o długości 11cm i zakresie pH 4-7 (gradient liniowy) (Immobiline DryStrip Gels); GE Healthcare Life Sciences (USA)
- olej (Immobiline DryStrip Cover Fluid), GE Healthcare Life Sciences (USA)

Odczynniki stosowane do rozdzielania białek w drugim kierunku elektroforezy dwukierunkowej:

- TRIS; Bioshop (Kanada)
- glicyna; Bioshop (Kanada)
- dodecylsulfian sodu (SDS); Bioshop, Polska,
- ditiotretitol (DTT); Bioshop, Polska,
- jodoacetamid (IAA); Bioshop, Polska,
- mocznik; Bioshop (Kanada)
- glicerol; Bioshop (Kanada)

- błękit bromofenolowy; Bioshop (Kanada)
- mieszanina akrylamidu i bisakrylamidu (37,5:1); Bioshop (Kanada)
- nadsiarczan amonu; Bioshop (Kanada)
- *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina (TEMED); Bioshop (Kanada)
- agaroz; Bioshop (Kanada)
- białkowy marker wielkości mas; GE Healthcare Life Sciences (USA)

Odczynniki stosowane do utrwalania i barwienia białek:

- kwas octowy; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)
- etanol; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)
- metanol; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)
- błękit Coomassie G-250; Bioshop (Kanada)
- siarczan amonu; Bioshop (Kanada)
- kwas ortofosforowy; Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)

Odczynniki stosowane do trawienia enzymatycznego białek:

- acetonitryl; Sigma-Aldrich (Niemcy)
- diwęglan amonu; Sigma-Aldrich (Niemcy)
- tripsyna; Promega (Niemcy)

Odczynniki stosowane do analizy białek metodami spektrometrii mas:

- acetonitryl; Sigma-Aldrich (Niemcy)
- kwas α -cyjano-4- hydroksycynamonowy; Bruker Daltonics (Niemcy)
- standardy mas peptydów o zakresie mas 700-3600 Da; Bruker Daltonics (Niemcy)

Czystość wszystkich stosowanych odczynników była na poziomie „czysty do analizy” i wyższym. Do sporządzania roztworów odczynników i buforów wykorzystywano wodę dejonizowaną o oporności 18.2 MOh $\cdot$ m, otrzymywaną w systemie Pacific (TKA, Niemcy).

3.2. Materiał roślinny i warunki hodowli

Badania były prowadzone na 104 genotypach dwurzędowego jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.):

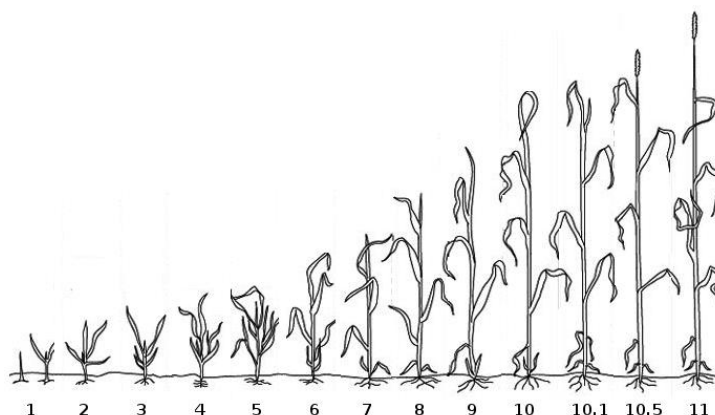
- 2 odmiany rodzicielskie: Maresi (Niemcy), Cam/B1//CI08887/CI05761 (w dalszej części pracy nazywany Cam/B1/CI) (Syria)
- 2 odmiany referencyjne: Sebastian (Dania), Stratus (Polska)
- populacja mapująca składająca się ze ósmego pokolenia (F₈)100 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL, *ang. recombinant inbred line*) otrzymanych techniką pojedynczego ziarna, pochodzących ze skrzyżowania Maresi i Cam/B1/CI (populacja M_{Cam}).

Wszystkie rośliny użyte w doświadczeniach były hodowane w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu w ramach projektu POLAPGEN-BD przez pracowników z Zespołu Fenotypowania i Genotypowania Zbóż z Zakładu Biotechnologii kierowanego przez prof. dr hab. Tadeusza Adamskiego.

Nasiona jęczmienia wysiewano do doniczek wypełnionych 8 kg piasku gliniastego (dostarczonego przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach) pomieszanego z piaskiem suchym w stosunku wagowym 7:2. Zastosowanie takich proporcji gleby zapewniło dobrą przewodność wody w doniczkach. W każdej doniczce wysiewano po 25 nasion. Hodowla roślin prowadzona była w szklarni, w częściowo kontrolowanych warunkach temperatury oraz naświetlenia.

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; ryc. 3.1.), 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 było 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). Następnie dolewano odpowiednią ilość wody w celu utrzymania ustalonych wartości pF. Liście zbierano w dwóch powtórzeniach biologicznych po 10 dniach od rozpoczęcia suszy. Na każde powtórzenie biologiczne składała się pula 10 roślin wzrastających w jednej doniczce. Zebrany materiał natychmiast zamrażano w ciekłym azocie, po czym przechowywano go w temperaturze -80°C do momentu rozpoczęcia analiz



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

3.3. Izolacja i oczyszczanie białek cytoplazmatycznych z tkanki liściowej

Ekstrakcja białek cytoplazmatycznych jęczmienia była przeprowadzona metodą fenolową (fenoliza), opracowaną przez Hurkmana i Tanakę (Hurkman i Tanaka, 1986).

W pierwszym etapie procedury zamrożoną tkankę liściową umieszczono w schłodzonych ciekłym azotem naczyniach ze stali nierdzewnej o pojemności 50 ml z dwiema stalowymi kulami o średnicy 12 mm i homogenizowano w młynku kulowym (MM400, Retsch, Niemcy) przez 45 sekund z częstotliwością 30 Hz. Następnie odważano po 300mg sproszkowanej tkanki i zawieszano w 750μl buforu ekstrakcyjnego z inhibitorami proteaz (tab. 3.1.). Po 10 minutach inkubacji na lodzie, do prób dodawano wodny roztwór fenolu z dodatkiem barwnika 8-hydroksychinoliny w stosunku objętościowym 1:1 i wytrząsano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Ekstrakt wirowano z prędkością 11

000 g w wirówce Universal 320R (Hettich, Niemcy) przez 10 minut, w temperaturze 4° C. Górą fazę fenolową zbierano, po czym ponownie wytrząsano z buforem ekstrakcyjnym w stosunku objętościowym 1:1, w celu usunięcia zanieczyszczeń. Próby ponownie wirowano (11 000g, 10 min, 4° C). Następnie górną fazę fenolową przeniesiono do nowych probówek. Białka wytrącano z fazy fenolowej poprzez dodanie pięciu objętości 0,1M octanu amonu rozpuszczonego w lodowatym metanolu. Po 24-godzinnym etapie inkubacji w temperaturze -20° C próby wirowano przez 5 minut z prędkością 11 000 g, w temperaturze 4° C. Następnie poprzez zawieszanie w 1ml 0.1M octanu amonu rozpuszczanego w lodowatym metanolu osad białkowy przenoszono do nowej probówki i ponownie wirowano. W celu usunięcia związków fenolowych białka ponownie zawieszano w 0.1M octanie amonu rozpuszczonego w metanolu z dodatkiem 1% poliwinylpirolidonu. Zawieszony osad wirowano, zbierano i ponownie zawieszano w 0.1M octanie amonu rozpuszczonym w metanolu. Tak przygotowany osad doczyszczano poprzez przemycie 80% roztworem acetonu. Próby zostawiono do wyschnięcia na lodzie przez 20 minut. Uzyskany osad białkowy był w kolejnych etapach przygotowywany do dwukierunkowego rozdziału elektroforetycznego.

Tab.3.1. Skład buforu ekstrakcyjnego.

sacharoza	700 mM
EDTA	50 mM
KCl	100 mM
β-merkaptotanol	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.

Oczyszczony, a następnie osuszony osad białkowy rozpuszczano w 300 μ l buforu rehydratacyjnego (tab. 3.2.) i wytrząsano 30 minut, do momentu uzyskania jednorodnego roztworu.

Pomiar stężenia białka zawartego w próbce był wykonywany z wykorzystaniem zestawu 2D Quant Kit. Standardem białkowym użytym do sporządzenia krzywej wzorcowej była albumina z surowicy bydlęcej w odpowiednio wzrastających stężeniach. Do pomiaru stężenia białka wzięto po 2 μ l badanych próbek. Wartość absorbancji mierzono przy długości fali równej 480 nm na spektrofotometrze DU-62 (Beckman, Niemcy).

Każda z prób zawierała po 300 μ g białka rozpuszczonego w roztworze rehydratacyjnym, 55mM ditiotretolu, 0,5% mieszaniny amfolitów o pH w zakresie 4-7 oraz 0,25 % barwnika błękitu bromofenolowego. Objętość końcowa prób wynosiła 200 μ l. Przygotowane próby wirowano 5 minut z prędkością 11 000 g, po czym nakładano na ceramiczne rynienki o długości 11 cm. Na rozprowadzoną po powierzchni rynienki próbkę nakładano paski żelowe z unieruchomionym gradientem pH 4-7 o długości 11 cm. Po usunięciu powietrza spod powierzchni pasków całość pokrywano 700 μ l oleju. 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 rozdzieleniu 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
Stałe	50	9:00	0.45
Gradientowe	50-500	0:40	0.25
Stałe	500	1:00	0.5
Gradientowe	500-1000	0:20	0.25
Gradientowe	1000-6000	2:30	8.8
Stałe	6000	2:30	15
SUMA		19	24,8

Paski żelowe z rozdzielonymi białkami inkubowano dwukrotnie po 15 minut z wytrząsaniem w 5 ml buforze wyrównującym pH żelu (tab. 3.3). W pierwszym etapie równoważenia bufor dodatkowo zawierał 1,5 % ditiotreitol, co umożliwiło przeprowadzenie reakcji redukcji mostków dwusiarczkowych rozdzielonych białek. Po 15 minutach inkubacji wymieniono bufor na świeży, który zawierał 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. 3.4.). 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 dzień wcześniej w celu zapewnienia całkowitego procesu polimeryzacji żeli. Pomiędzy paskami żelowymi nakładano marker wielkości, składający się z mieszaniny białek o zakresie mas cząsteczkowych od 10 do 100 kDa. Następnie na paski żelowe umieszczone w płytach rozprowadzano 1 ml 1% agarozy w celu ich unieruchomienia i zapewnienia ścisłego przylegania do krawędzi żelu poliakrylamidowego. 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. 3.5.) i katodowy (tab. 3.6.). 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 zakończeniu rozdzielania żele inkubowano w roztworze do utrwalania białek (100 ml/żel) z lekkim wytrząsaniem przez 3 godziny (tab. 3.7.). Po

procesie utrwalania rozdzielone białka na żelach wybarwiano błękitem Coomassie (G-250) w wersji koloidalnej (Neuhoff i in., 1985). Żele inkubowano z lekkim wytrząsaniem przez 12 godzin (tab. 3.8.). Na jeden żel zużywano 100 ml roztworu do barwienia, na który składało się 80 ml barwinka Coomassie i 20 ml metanolu. Po okresie inkubacji roztwór był zlewany, a nadmiar związanego barwinka (tło) odpukiwano poprzez kilkukrotną inkubację w wodzie z lekkim wytrząsaniem. Po odpukaniu tła, żele skanowano na optycznym skanerze Image Scanner III (GE Healthcare Life Sciences, USA) w programie LabScan (GE Healthcare Life Sciences, USA) w rozdzielczości 300 dpi. Po udokumentowaniu, żele były przechowywane w 2% roztworze kwasu fosforowego, w temperaturze 4° C.

Tab. 3.3. Skład buforu wyrównującego.

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

Tab. 3.4. Skład żelu poliakrylamidowego.

Akrylamid/Bisakrylamid (40%)	12%
Tris-HCl, pH 8.8 (1.5 M)	40 mM
TEMED	0,07% (v/v)
SDS (10%)	0,1% (v/v)
APS (10%)	0,05% (v/v)

Tab. 3.5 Skład buforu anodowego.

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

Tab. 3.6. Skład buforu katodowego.

Tris	25 mM
Glicyna	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

Tab. 3.7. Skład roztworu do utrwalania białek w żelu poliakrylamidowym.

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

Tab. 3.8 Skład barwnika Coomassie w wersji koloidalnej

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

3.5. Analiza statystyczna

Do analizy komputerowej uzyskanych elektroforegramów w celu wyselekcjonowania białek o zmienionym profilu akumulacji w suszy w genotypach rodzicielskich (Maresi, Cam/B1/CI), referencyjnych (Sebastian, Stratus) oraz 100 genotypów populacji mapującej MCam wykorzystano program Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences, USA). Do analizy wykorzystano po 8 żeli z każdej badanej odmiany i linii (4 elektroforegramy uzyskane z roślin wzrastających w warunkach kontrolnych i 4 z roślin poddanych działaniu suszy). Łącznie przeanalizowano 832 elektroforegramy.

Na odpowiednio przygotowanych obrazach żeli następowało automatyczne wykrywanie plamek białkowych po uprzednim ustawieniu wartości dla parametrów: wygładzenie plamek (ang. *smooth*) – 3, krzywizna plamek (w zależności od genotypu) (ang. *saliency*) – 30-40, minimalna powierzchnia plamki (ang. *minimal area*) – 20. Po wykryciu plamek, na każdym żelu ustalano od 4 do 5 znaczników (ang. *landmark*), stanowiących wyraźne plamki o średniej wielkości i okrągłym kształcie, które były obecne na każdym

z elektroforegramów. W kolejnym etapie analizy następowało automatyczne dopasowanie plamek (ang. *matching*) pomiędzy powtórzeniami żeli uzyskanych z roślin kontrolnych i poddanych działaniu suszowy oraz pomiędzy badanymi warunkami eksperymentalnymi (kontrola vs susza). Aby podwyższyć dokładność analizy i stopień trafności dopasowania plamek białkowych pomiędzy żelami przeprowadzono dodatkowo korekcję dopasowywania niektórych plamek. Edycja polegała głównie na dodawaniu lub usuwaniu plamek oraz zestawów połączeń (ang. *matchset*), które nie zostały lub zostały błędnie dodane 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. Ten parametr jest względnie niezależny od zmienności poziomu intensywności wybarwienia pomiędzy żelami spowodowanymi np. błędami technicznymi powstałymi podczas nakładania prób białkowych na żel lub podczas procedury barwienia. Analiza statystyczna różnic pomiędzy poziomem akumulacji białek w kontroli i suszy 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 (analiza niecelowana)

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. Podstawę do wykonania analiz w tym podejściu były wcześniej opracowane elektroforegramy w analizach pojedynczych genotypów (kontrola vs susza).

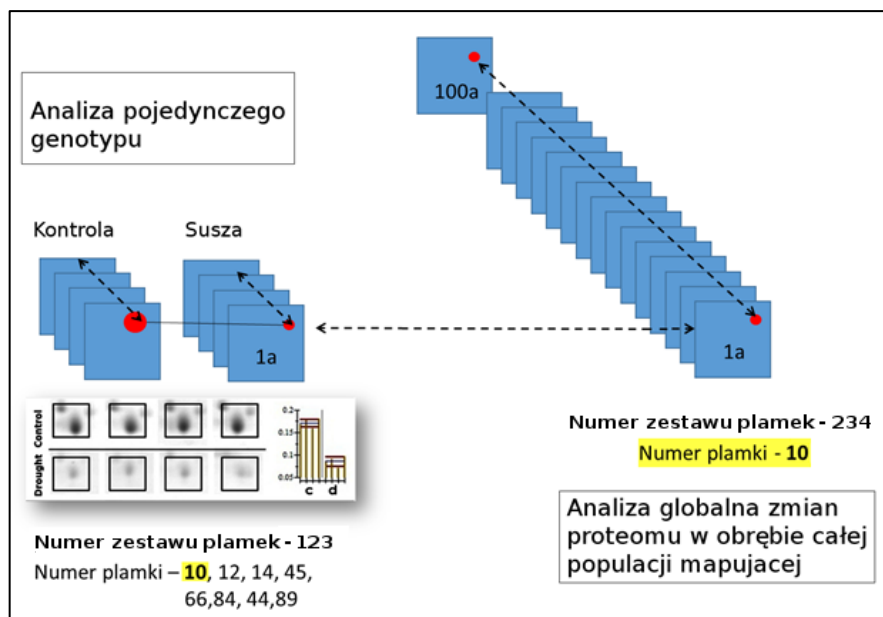
Do analizy całościowej zmian proteomu wybrano 102 żełe referencyjne (po jednym z każdego genotypu), które posiadały już wykryte plamki białkowe z nadaną numeracją i były składnikami zestawu plamek obejmującego profil akumulacji danego białka

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 102 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 dla projektu zawierającego 102 żele (analiza niecelowana) i projektów, w których analizowano pojedynczo linie hodowlane populacji mapującej oraz odmiany rodzicielskie 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, Wielka Brytania).

Dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne (HCA, ang. *Hierarchical Clustering Analysis*) zostało przeprowadzone w programie PermutMatrix (Caraux i Pinloche, 2005) dla efektu suszy wybranych białek. Grupowanie wykonano metodą Warda na podstawie odległości euklidesowej. Spośród grupy białek o statystycznie istotnej interakcji susza x genotyp, do analizy HCA wybrano 46, które były obserwowane w przynajmniej 75 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 całej populacji mapującej. Kolorem żółtym wyróżniono przykładowy numer plamki, dzięki której możliwe było odnalezienie odpowiedniego zestawu plamek w konkretnej analizie pojedynczego genotypu i wyodrębnienie profilu akumulacji białka w warunkach kontrolnych i suszy.

3.6. Trawienie enzymatyczne białek z żelu poliakrylamidowego

Uwidocznione na elektroforegramie plamki, reprezentujące rozdzielone białka zostały wycięte z żelu przy pomocy skalpela i następnie przełożone do probówek. Trawienie enzymatyczne białek zostało przeprowadzone zgodnie z protokołem opracowanym przez Schevchenkę (Shevchenko i in., 1996).

W pierwszym etapie wycięte kawałki żelu przemywano 100 μ l roztworu 50 mM diwęglanu amonu : acetonitryl (50:50). Po 15 minutach roztwór był usuwany, a białka przemywano 100 μ l acetonitrylu. Następnie dodawano 100 μ l 50mM diwęglanu amonu i inkubowano przez 15 minut. Całość usuwano, a białka przemywano dwukrotnie acetonitrylem, po czym suszono przez 5 min w koncentratorze próżniowym Concentrator 5301 (Eppendorf, Niemcy). Do wysuszonych kawałków żelu dodawano po 10 μ l trypsyny o stężeniu 20 ng/ μ l w 25 mM roztworze diwęglanu amonu i inkubowano w temperaturze

37° C przez 12 godzin. Po okresie inkubacji w celu wyekstrahowania peptydów z żelu do prób dodawano 1 µl acetonitrylu, po czym wirowano przez 1 min z prędkością 5000 g w wirówce MiniSpin (Eppendorf, Niemcy), a następnie próby poddano działaniu ultradźwięków przez 5 minut i ponownie zwirowano. Próby przechowywano w temperaturze -20° C.

3.7. Identyfikacja białek metodami spektrometrii mas

Do analizy wyciętych z żelu białek wykorzystano spektrometry masowe MALDI-TOF Autoflex oraz MALDI-TOF/TOF Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics, Niemcy). Metodą identyfikacji był metody peptydowy odcisk palca (PMF, ang. *peptide mass fingerprinting*). W przypadku niepowodzenia identyfikacji najbardziej intensywne peptydy na widmie podlegały fragmentacji (MALDI-TOF/TOF) i na podstawie mas uzyskanych fragmentów następowała kolejna próba identyfikacji.

Próbki do pomiarów spektrometrycznych nakładano metodą suchej kropli. Przed nałożeniem na płytkę analityczną uzyskane po trawieniu enzymatycznym peptydy poddawano oczyszczaniu i zateżaniu za pomocą końcówek ZipTip® (Merck Millipore, Niemcy). 0,5 µl roztworu uzyskanych peptydów nakładano na płytkę AnchorChip o średnicy studzienek 600 µm (Bruker Daltonics, Niemcy) i następnie наносzono równą objętość matrycy, którą stanowił przesycony roztwór kwasu α-cyjano-4-hydroksycynamonowego rozpuszczonego w 50% acetonitrylu i zawierający 0,1% kwasu trifluorooctowego.

Przed pomiarami spektrometr był kalibrowany przy użyciu standardów peptydowych o zakresie mas od 700 do 3600 Da (Bruker Daltonics, Niemcy). Jonizacja następowała w wyniku wzbudzenia próbek promieniami lasera azotowego działającego emitującego światło w zakresie ultrafioletu o długości fali 337 nm. Wszystkie analizy przeprowadzono w dodatnim polu jonizującym. W celu optymalizacji trajektorii lotu promieni jonów i zwiększenia rozdzielczości pomiary były wykonywane z użyciem reflektoru (tryb z odbiciem), dzięki czemu możliwe było obserwowanie na widmie rozkładu izotopowego dla większości pików (ryc. 4.3.). Dla każdej próbki rejestrowano widma mas uzyskane w wyniku zsumowania przynajmniej 60 strzałów lasera.

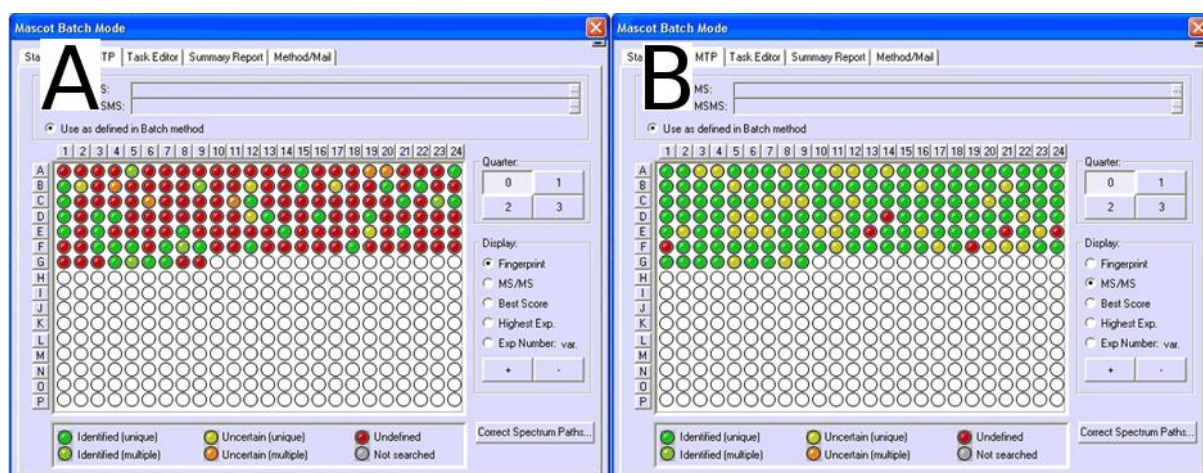
Widma masowe były wykonywane w programie Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, Niemcy) i podlegały edycji w programie Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics, Niemcy). Masy

pików na widmie były kalibrowane przy użyciu mas peptydów pochodzących z autolizy trypsyny oraz powszechnie występujących zanieczyszczeń – keratyn, które po procesie kalibracji usuwano z widma. Wykorzystanie dwóch wysokorozdzielczych analizatorów czasu przelotu jonów (MALDI-TOF/TOF) pozwoliło na fragmentację wybranych pików i uzyskanie widm MS/MS, co przeważnie skutkowało identyfikacją większej liczby białek (ryc. 3.3.).

Do identyfikacji białek wykorzystywano oprogramowanie BioTools 3.2 (Bruker Daltonics, Niemcy) oraz serwer MASCOT 2.3 (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>), korzystający z białkowych i nukleotydowych baz danych. Białka identyfikowano w bazie SwissProt oraz NCBI.

W celu poprawienia jakości otrzymywanych wyników w silniku MASCOT ustawiono dodatkowe parametry wyszukiwania potencjalnych identyfikacji. Obszar taksonomiczny został zawężony do roślin zielonych (*Viridiplantae*), określono enzym użyty do trawienia z możliwością wykonania jednej błędnej lub braku hydrolizy wiązania peptydowego w sekwencji aminokwasowej białka. Jako modyfikacje stałe ustalono karbamidometylację reszt cysteiny (efekt traktowania pasków żelowych buforem zawierającym jodoacetamid), a jako modyfikację prawdopodobną oksydację metioniny. Określono zakres tolerancji dla mas peptydów, który wynosił 0.2 Da. Uwzględniono, że widmo zostało wykonane w trybie jonów dodatnich, a obserwowane piki posiadają masę monoizotopową. W trybie analiz MS/MS analizowano pięć najbardziej intensywnych peptydów na widmie, 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. Jeżeli wartość znajdowała się na poziomie ufności $p=95\%$ uznawano, że białko zostało prawidłowo zidentyfikowane lub posiada wysoki stopień homologii ze zidentyfikowanym w bazie białkiem. Ponadto uwzględniano stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej, liczbę dopasowanych pików, organizm, z którego pochodzi zidentyfikowane białko, masę cząsteczkową i punkt izoelektryczny.



Ryc.3.3. Porównanie skuteczności identyfikacji białek za pomocą peptydowego odcisku palca (A) i fragmentacji (MS/MS) (B). Kolor czerwony – brak identyfikacji, kolor zielony – identyfikacja, kolor żółty – identyfikacja niepewna.

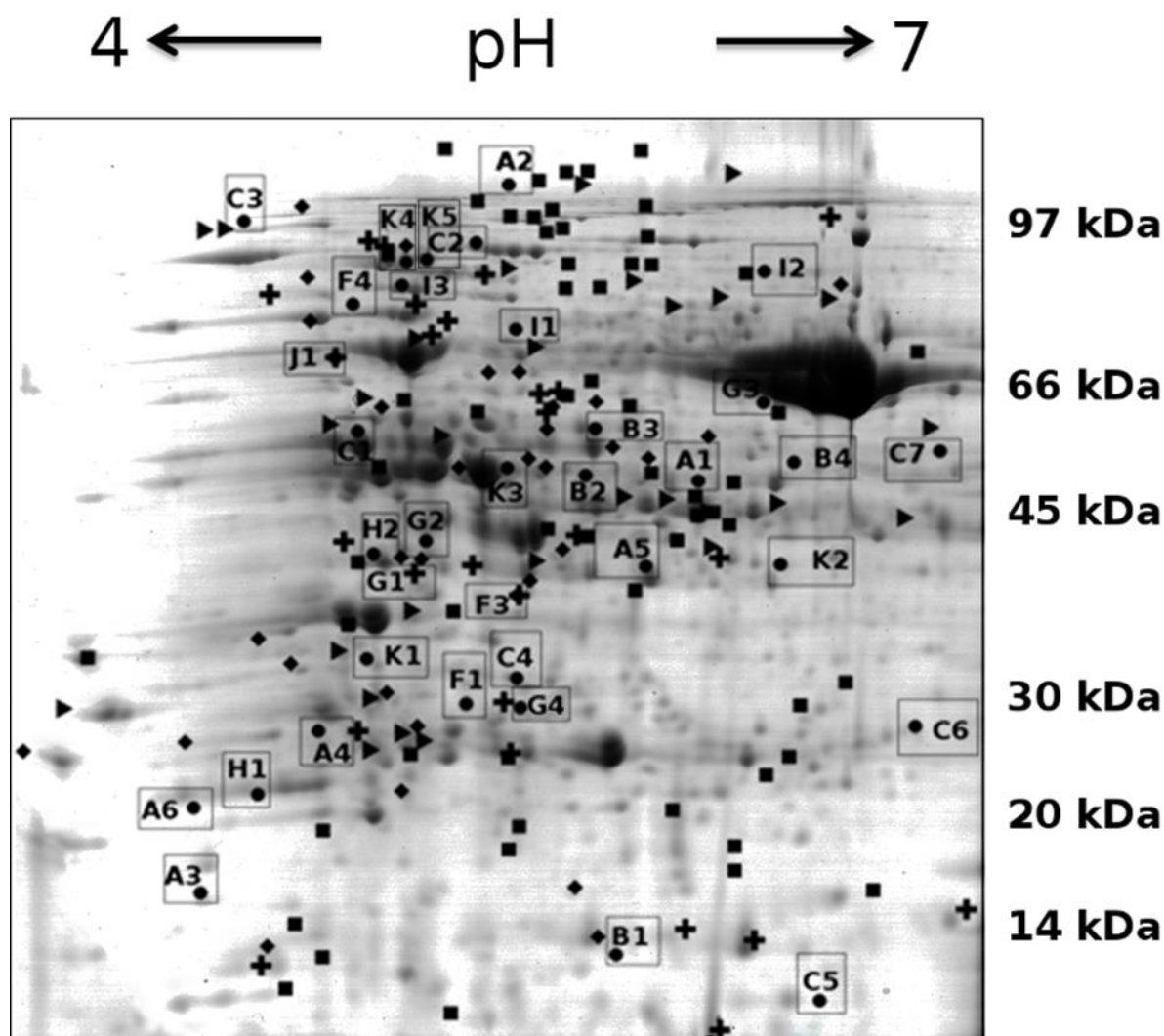
4. WYNIKI

4.1. Analiza proteomiczna genotypów rodzicielskich i referencyjnych

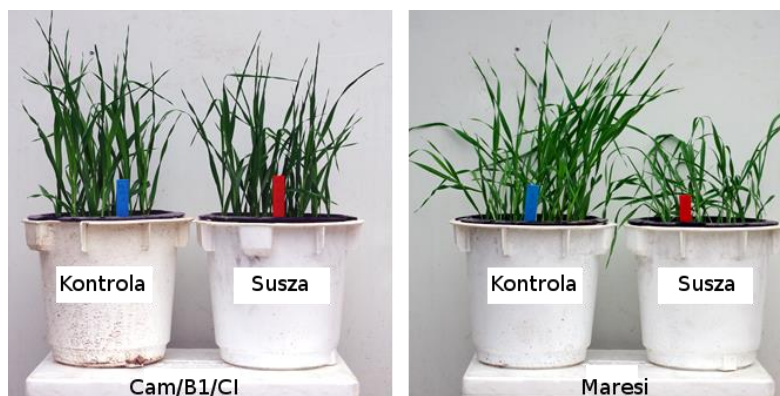
Dwukierunkowa elektroforeza żelowa została wykorzystana do monitorowania zmian w profilu akumulacji białek w liściach genotypów rodzicielskich jęczmienia jarego: Maresi i Cam/B1/CI oraz w dwóch referencyjnych: Sebastian i Stratus. Ponad 1000 plamek zostało wykrytych na elektroforegramach ekstraktów białkowych z roślin kontrolnych i poddanych działaniu suszy (ryc. 4.1.).

Maresi jest odmianą dwurzędową, wyhodowaną w Niemczech, posiadającą gen półkarłowatości *denso*, który zapewnia podwyższoną odporność na wyleganie (Kuczynska i Wyka, 2011). Cam/B1/CI jest linią hodowlaną pochodzenia syryjskiego. 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). W badaniach, gdzie bezpośrednio porównywano formy rodzicielskie, odmiana syryjska charakteryzowała się efektywniejszym współczynnikiem wykorzystania wody (WUE, ang. *water use efficiency*) oraz azotu w warunkach ograniczonej dostępności tego pierwiastka. Natomiast w warunkach deficytu wody zarówno Cam/B1/CI jak i Maresi odznaczały się dość wysokim indeksem odporności na suszę (Górny, 2001).

W doświadczeniu szklarniowym przeprowadzonym w Instytucie Genetyki Roślin zastosowane warunki suszy w większym stopniu zahamowały wzrost odmiany niemieckiej, podczas gdy w Cam/B1/CI redukcja biomasy w porównaniu do roślin kontrolnych była znacznie niższa (ryc.4.2.).



Ryc. 4.1. Elektroforegram rozdzielonych białek liścia jęczmienia. Naniesione kształty reprezentują białka, które zareagowały na suszę w poszczególnych genotypach: Maresi (■), Cam/B1/CI/ (►), Stratus (◆), Sebastian (+). Plamki otoczone ramką reprezentują białka, których profil akumulacji zmieniał się przynajmniej w dwóch odmianach (opis zmian poziomu akumulacji dla tych białek umieszczono w tabelach 4.1-4.4 oraz 4.6).



Ryc. 4.2. Porównanie odmian rodzicielskich w kontroli i po 10 dniach od momentu rozpoczęcia suszy.

Rozdzielone białka na żelach poliakrylamidowych każdej z odmian podlegały ocenie statystycznej w celu identyfikacji plamek różnicujących rośliny wzrastające w warunkach kontrolnych i poddanych działaniu suszy. Analiza statystyczna umożliwiła detekcję 218 białek (łącznie dla wszystkich 4 genotypów) o zmienionym profilu akumulacji w porównaniu do roślin kontrolnych (tab.4.1-4.4.). Reprezentatywne elektroforegramy dla badanych genotypów z naniesioną numeracją białek o zmienionym profilu akumulacji w suszy zostały umieszczone w materiałach dodatkowych (ryc. S1-S4).

Tab. 4.1. Białka, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w lini hodowlanej Cam/B1/CI. Tabela w większej rozdzielczości jest dostępna na płycie CD.

Nr plamki	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola [% objętościowy]	Susza [% objętościowy]	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT (p<0,05)	% pokrycia sekwencji	pI (teoretyczne)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	pI (eksperymentalne)	Masa cząsteczkowa (eksperymentalna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Pozycja na żelu
1	Peroکsyredoksyna dwucysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	6,68E-03	0.012	0.038	3.1	WZROST	PMF	82	40	5.4	23398	6.4	11494	BAS1 HORVU	C5
2	Domena wiążąca RNA	<i>Hordeum vulgare</i>	1,63E-04	0.142	0.039	0.3	spadek	PMF	85	36	4.8	30719	4.3	32125	gi326516784	
3	S-transferaza glutationu	<i>Hordeum vulgare</i>	3,58E-03	0.026	0.061	2.4	WZROST	PMF	112	34	8.9	33484	5.6	34009	gi326507956	C4
4	C-koncowa hydrolaza ubikwityny 19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,94E-03	0.021	0.065	3.1	WZROST	MS/MS	28	1	4.8	77097	5.2	34662	GPM1 DINSH	K1
5	Białko kompleksu wydzielającego tlen	<i>Solanum tuberosum</i>	4,76E-02	0.520	0.11	0.2	spadek	MS/MS	312	13	5.8	35595	5.3	37353	PSBO SOLTU	
6	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Hordeum vulgare</i>	9,98E-03	0.168	0.098	0.6	spadek	PMF	101	39	8.3	39971	6.4	40252	gi326492141	K2
7	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Triticum aestivum</i>	2,19E-03	0.202	0.248	1.2	WZROST	PMF	105	48	6.9	40491	5.7	40252	gi20302473	
8	Niezidentyfikowane		3,07E-02	0.014	0.036	2.7	WZROST						6.2	41337		
9	Niezidentyfikowane		1,63E-03	0.071	0.184	2.6	WZROST						5.2	40869		
10	Niezidentyfikowane		2,17E-01	0.128	0.166	1.3	WZROST						6.7	43222		
11	Niezidentyfikowane		2,35E-04	0.056	0.103	1.8	WZROST						6.0	44377		
12	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	<i>Triticum aestivum</i>	5,64E-04	0.012	0.186	15.7	WZROST	PMF	145	41	6.9	48012	5.6	47387	gi7960277	K3
15	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Bromheadia finlaysoniana</i>	7,68E-05	0.051	0.023	0.4	spadek	MS/MS	39	2	7.1	76605	5.1	65229	PALY BROFI	J1
16	Dehydrogenaza glutaminianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	5,99E-03	0.027	0.106	3.9	WZROST	PMF	86	27	5.3	54461	5.6	66998	gi326519016	
17	Enolaza	<i>Hordeum vulgare</i>	6,68E-04	0.220	0.279	1.3	WZROST	PMF	132	39	5.4	48601	5.6	69269	gi326490934	I1
18	Reduktaza glutationu (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	5,44E-03	0.024	0.032	1.4	WZROST	PMF	87	28	7.6	59615	6.0	72942	gi157362217	
20	Syntaza ATP, podjednostka alfa (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,80E-02	0.031	0.048	1.6	WZROST	PMF	76	19	6.3	55317	5.9	76683	ATPA HORVU	
21	Reduktaza ferredoksyna-azoty	<i>Hordeum vulgare</i>	3,33E-04	0.083	0.034	0.4	spadek	PMF	122	20	6.3	66660	6.3	78493	gi326505210	I2
23	Białko szoku cieplnego 70 kDa (mitochondrialne)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	9,28E-03	0.044	0.057	1.3	WZROST	MS/MS	121	3	6.0	72721	5.5	82794	HSP7M PHAVU	C2
24	Białko szoku cieplnego 70 kDa (chloroplastowe)	<i>Hordeum vulgare</i>	9,86E-04	0.157	0.086	0.5	spadek	PMF	120	21	5.0	73955	4.8	85601	gi326492960	C3
25	Niezidentyfikowane		1,02E-02	0.043	0.079	1.8	WZROST	PMF	122	39	5.7	35765	6.2	43542	gi326517467	
26	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	<i>Hordeum vulgare</i>	5,39E-04		0.056		WZROST	PMF	114	31	6.1	39064	6.8	48286	gi226316443	C7
27	Niezidentyfikowane		1,76E-03	0.006	0.021	3.5	WZROST						6.2	74416		
28	Białko szoku cieplnego 70 kDa (chloroplastowe)	<i>Brachypodium distachyon</i>	3,74E-03	0.168	0.128	0.8	spadek	PMF	107	25	5.0	73203	4.7	84890	gi357134135	
29	Białko szoku cieplnego 70 kDa (chloroplastowe)	<i>Spinacia oleracea</i>	2,60E-02	0.135	0.066	0.5	spadek	MS/MS	108	4	4.9	64918	4.7	85458	HSP7S SPIOL	
30	Niezidentyfikowane		9,70E-04	0.047	0.117	2.5	WZROST						5.2	30460		
33	Niezidentyfikowane		7,32E-03		0.042		WZROST						6.8	31162		C6
34	Peroکsydaza askorbinianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,68E-04		0.148		WZROST	PMF	117	49	5.1	27964	5.2	32907	gi15808779	
36	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	<i>Zea mays</i>	1,53E-04		0.019		WZROST	MS/MS	40	2	7.0	43182	6.4	44377	G3PA MAIZE	
37	Niezidentyfikowane		6,55E-04		0.042		WZROST						5.9	44716		
38	Dehydrogenaza L-izodonianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	5,55E-09		0.04		WZROST	PMF	199	58	6.3	39564	6.8	54434	gi326515958	
39	Syntetaza glutaminianowa (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,57E-04	0.937	2.308	2.5	WZROST	PMF	119	40	5.8	46902	5.1	53295	gi755762	C1
40	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Hordeum vulgare</i>	4,91E-04		0.135		WZROST	PMF	194	39	8.0	51383	5.1	57456	RCAA HORVU	
42	Syntetaza glutaminianowa (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	7,60E-03	0.087			spadek	MS/MS	243	7	5.1	47406	5.0	31360	GLNA2 HORVU	
44	Proteaza kazeinolityczna (Clp), domena wiążąca ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	2,82E-02	0.056	0.077	1.4	WZROST	PMF	127	21	6.7	102090	5.8	93196	gi326514880	
46	Peroکsydaza askorbinianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	3,57E-02	0.013	0.038	2.9	WZROST	PMF			5.9	27532	5.2	35670	gi3688396	
47	Dehydrogenaza aldehydu betainowego	<i>Hordeum vulgare</i>	1,21E-03	0.023	0.059	2.5	WZROST	PMF	85	19	5.5	55276	5.1	68540	gi15147871	
48	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO	<i>Secale cereale</i>	5,62E-03	0.441	0.32	0.7	spadek	MS/MS			4.7	53721	5.7	68900	RUBB SECCE	I3
49	Proteaza kazeino-lityczna (Clp), domena wiążąca ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	1,54E-02	0.027	0.037	1.4	WZROST	PMF	127	21	6.7	102090	6.4	102889	gi326514880	
50	Białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego	<i>Solanum lycopersicum</i>	2,02E-03	0.008	0.038	5.0	WZROST	MS/MS	90	4	5.0	73475	5.3	86300	BIP SOLL	K4
51	Białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego, izoforma 2	<i>Hordeum vulgare</i>	3,78E-03	0.007	0.041	5.8	WZROST	PMF	96	29	5.1	73301	5.1	79546	gi326495158	K5

Tab 4.2. Białka, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Maresi. Tabela w większej rozdzielczości jest dostępna na płycie CD.

Nr planki	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola [% objętościowy]	Susza [% objętościowy]	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT (p<0,05)	% pokrycia sekwencji	pI (teoretyczne)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	pI (eksperymentalne)	Masa cząsteczkowa (eksperymentalna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Pozycja na żelu
1	Peroxisredoxyna dwucysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	8,25E-03	0.016	0.053	3.4	WZROST	PMF	82	40	5.4	23398	6.4	11494	BAS1_HORVU	C5
2	Niezidentyfikowane		9,25E-03	0.015	0.056	3.7	WZROST						5.3	11794		
3	Syntetaza delta-1-pirrolino-5-karboksylam	<i>Vigna acuminifolia</i>	1,03E-03	0.050	0.025	0.5	spadek	PMF	33	1	6.6	73531	5.6	32575	P5CS_VIGAC	G4
4	Kompleks żelazowo-siarkowy cytochromu b6f	<i>Hordeum vulgare</i>	2,47E-03	0.045	0.117	2.6	WZROST	PMF	74	22	8.5	24124	5.9	14400	gi326518434	B1
5	Niezidentyfikowane		1,25E-02	0.016	0.042	2.6	WZROST						6.2	19744		
6	Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu	<i>Medicago sativa</i>	4,13E-02	0.018	0.043	2.4	WZROST	MS/MS	30	2	7.8	39458	4.7	20351	MTDH_MEDSA	A3
7	Białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego	<i>Solanum lycopersicum</i>	2,36E-02	0.005	0.022	4.3	WZROST	MS/MS	82	26	5.0	73475	5.3	86300	BIP_SOLLIC	K4
9	Białko rybosomalne z rodziny L10	<i>Hordeum vulgare</i>	3,83E-02	0.069	0.052	0.8	spadek	PMF	121	43	8.3	24197	6.0	24566	gi326507838	
10	S-transferaza glutationu	<i>Hordeum vulgare</i>	3,10E-04	0.039	0.077	2.0	WZROST	PMF	71	37	5.7	23557	6.3	27108	gi326490728	
11	Peroxisredoxyna dwucysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,36E-03	0.026	0.071	2.7	WZROST	MS/MS	82	40	5.4	23398	4.8	26718	BAS1_HORVU	
12	Niezidentyfikowane		5,73E-03	0.014			spadek						6.3	28559		
13	Białko kompleksu wydzielającego tlen (prekursor)	<i>Triticum aestivum</i>	7,04E-03	0.095	0.174	1.8	WZROST	PMF	110	41	8.8	27424	5.5	30038	PSBP_WHEAT	
14	Niezidentyfikowane		7,78E-03	0.157	0.106	0.7	spadek						5.2	30498		
15	Białko rozpoznające sekwencję sygnałną	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,90E-02	0.067	0.041	0.6	spadek	MS/MS	29	1	9.7	53257	5.1	31123	SR5541_ARATH	A4
16	Peroxisydaza askorbinianowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,65E-05	0.019	0.045	2.4	WZROST	PMF	80	34	5.9	27532	6.4	31801	gi3688398	
18	S-transferaza glutationu	<i>Hordeum vulgare</i>	2,59E-03	0.011	0.039	3.5	WZROST	PMF	112	34	8.9	33484	5.6	33709	gi326507956	C4
19	C-końcowa hydrolaza ubikwityny 19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,12E-03	0.077	0.038	0.5	spadek	MS/MS	28	1	4.8	77097	5.2	34750	GPMI_DINSH	K1
20	Białko zawierające domenę wiążącą RNA	<i>Hordeum vulgare</i>	4,41E-03	0.024	0.079	3.2	WZROST	PMF	112	40	4.6	31872	4.3	35687	gi326493824	
21	Białko kompleksu wydzielającego tlen	<i>Solanum tuberosum</i>	4,15E-04	0.446	0.931	2.1	WZROST	MS/MS	330	13	5.8	35595	5.1	37164	PSBO_SOLTU	
22	Niezidentyfikowane		2,05E-04	0.024			spadek						5.9	38263		
23	Białko kompleksu wydzielającego tlen	<i>Solanum tuberosum</i>	1,93E-03	0.067	0.033	0.5	spadek	MS/MS	164	8	5.8	35595	5.3	39195	PSBO_SOLTU	G1
24	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Hordeum vulgare</i>	2,29E-05	0.171	0.086	0.5	spadek	PMF	90	32	8.3	39971	6.4	40457	gi326492141	K2
25	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Triticum aestivum</i>	8,78E-03	0.221	0.160	0.7	spadek	PMF	104	33	6.9	40491	5.8	39695	gi20302473	A5
26	Niezidentyfikowane		9,99E-04	0.054	0.170	3.1	WZROST						5.2	41128		
28	Syntaza cysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	3,17E-03	0.139	0.078	0.6	spadek	MS/MS	46	3	5.3	34207	5.3	41285	CYSK_HORVU	G2
29	Niezidentyfikowane		1,13E-02	0.041	0.029	0.7	spadek						6.2	42077		
30	Syntaza cysteinowa	<i>Triticum aestivum</i>	1,85E-05	0.060			spadek	PMF	85	40	5.5	34207	5.8	41600	3:J80762	
31	Niezidentyfikowane		2,58E-04	0.045			spadek	PMF	92	39	5.7	35765	6.1	42885	gi326517467	
33	Niezidentyfikowane		2,01E-04	0.033	0.077	2.3	WZROST						6.1	44041		
34	Niezidentyfikowane		1,81E-02	0.318	0.587	1.8	WZROST						6.2	45318		
35	Epimeraza UDP-galaktozy	<i>Hordeum vulgare</i>	1,08E-02	0.362	0.256	0.7	spadek	PMF	179	42	7.1	41582	6.0	45212	gi326523629	A1
36	Niezidentyfikowane		1,88E-02	0.052	0.023	0.4	spadek						5.9	46834		
37	Niezidentyfikowane		2,16E-02	0.073	0.031	0.4	spadek	PMF	77	39	7.6	68384	5.8	46724	3:J47968	B2
38	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	<i>Triticum aestivum</i>	3,22E-04	0.022	0.106	4.7	WZROST	PMF	145	41	6.9	48012	5.5	47387	gi7960277	K3
39	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	<i>Hordeum vulgare</i>	5,16E-03	0.309	0.237	0.8	spadek	PMF	198	53	6.1	38102	6.4	49901	gi326493652	B4
40	Niezidentyfikowane		5,17E-03	0.099	0.059	0.6	spadek						6.3	54306		
41	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (chloroplastowa)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,81E-03	0.672	0.381	0.6	spadek	MS/MS	121	3	9.8	40507	5.8	52425	G3PB_ARATH	B3
42	Syntetaza glutaminianowa (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,54E-04	1.343	0.839	0.6	spadek	PMF	119	40	5.8	46902	5.1	53295	gi755762	C1
43	Sulfurylaza ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	2,90E-03	0.067	0.043	0.6	spadek	PMF	102	31	6.0	39484	6.3	58684	gi326530496	G3
44	Niezidentyfikowane		4,27E-02	0.048	0.023	0.5	spadek						5.9	56519		
45	Czynnik elongacyjny Tu	<i>Brachypodium distachyon</i>	3,82E-03	0.630	0.342	0.5	spadek	PMF	220	52	5.9	50638	5.4	56519	gi357149925	
46	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Hordeum vulgare</i>	1,51E-02	0.363	0.229	0.6	WZROST	MS/MS	441	14	8.0	51383	5.2	58822	RCAA_HORVU	
47	Syntaza S-adenozylometioniny	<i>Hordeum vulgare</i>	2,92E-04	0.029			spadek	PMF	122	42	5.5	43138	5.7	58409	METK3_HORVU	
48	RuBisCO, duża podjednostka	<i>Hordeum vulgare</i>	1,71E-03	0.360	0.135	0.4	WZROST	MS/MS	346	8	6.2	53672	6.7	64014	RBL_HORVU	
49	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa	<i>Brachypodium distachyon</i>	1,72E-03	0.009			spadek	PMF	93	25	5.6	52860	5.8	60790	gi357110692	
50	Enolaza	<i>Hordeum vulgare</i>	5,46E-03	0.204	0.124	0.6	WZROST	PMF	132	39	5.4	48601	5.1	69384	gi326490934	I1
51	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	1,62E-02	0.116	0.011	0.1	WZROST	MS/MS	108	3	4.9	53721	6.3	74045	RUBB_SECCCE	
52	Niezidentyfikowane		1,52E-04	0.018			spadek						6.3	77196		
53	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	5,77E-05	0.651	0.246	0.4	WZROST	MS/MS	376	11	4.7	53721	5.2	76555	RUBB_SECCCE	I3
56	Reduktaza ferredoksyna-azotan	<i>Hordeum vulgare</i>	3,39E-02	0.099	0.054	0.5	WZROST	PMF	122	20	6.3	66660	6.3	78887	gi326505210	I2
57	Reduktaza ferredoksyna-azotan (prekursor)	<i>Triticum aestivum</i>	2,71E-05	0.013			spadek	PMF	118	26	6.3	66660	6.0	78624	gi326505210	
58	Niezidentyfikowane		7,92E-04	0.015			spadek						5.9	78493		
59	Proteasom 26S, domena regulatorowa	<i>Brachypodium distachyon</i>	7,36E-04	0.020			spadek	PMF	77	36	6.2	34848	5.7	78624	gi357166548	
60	Niezidentyfikowane		1,70E-02	0.085	0.055	0.6	WZROST						5.2	81290		
61	Niezidentyfikowane		5,91E-04	0.018	0.002	0.1	WZROST						6.0	82794		
62	Niezidentyfikowane		1,93E-03	0.012			spadek						5.7	84749		
63	Niezidentyfikowane		2,36E-03	0.023	0.015	0.6	WZROST						5.7	85174		
64	Białko szoku cieplnego 70 kDa (chloroplastowe)	<i>Hordeum vulgare</i>	4,59E-04	0.144	0.088	0.6	WZROST	PMF	94	18	5.0	73955	4.9	87768	gi326492960	C3
65	Białko zależne od pirrofosforanu timiny	<i>Hordeum vulgare</i>	3,01E-03	0.488	0.204	0.4	WZROST	PMF	163	37	5.5	74032	5.6	86750	gi326533372	
66	Białko zależne od pirrofosforanu timiny	<i>Hordeum vulgare</i>	1,09E-02	0.349	0.196	0.6	WZROST	PMF	124	30	5.5	74032	5.5	87185	gi326533372	
67	Syntetaza metioninowa	<i>Hordeum vulgare</i>	4,56E-03	0.037	0.019	0.5	WZROST	PMF	185	29	5.7	84794	5.9	87914	gi50897038	
69	Białko opieskie proteazy kazeino-litycznej	<i>Medicago truncatula</i>	7,72E-04	0.134	0.044	0.3	WZROST	PMF	145	26	6.4	102889	5.6	93507	gi357520587	
70	Białko opieskie proteazy kazeino-litycznej	<i>Oryza sativa</i>	8,44E-03	0.068	0.027	0.4	WZROST	PMF	233	30	6.1	101853	5.6	93663	CLCP1_ORYSJ	A2
71	Proteaza kazeinolityczna (Clp), domena wiążąca ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	1,91E-03	0.099	0.049	0.5	WZROST	PMF	133	21	6.7	102090	5.8	94763	gi326514880	
72	Proteaza kazeinolityczna (Clp), domena wiążąca ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	2,07E-04	0.049	0.021	0.4	WZROST	PMF	127	21	6.7	102090	5.7	94921	gi326514880	
73	Niezidentyfikowane		3,65E-04	0.015			spadek						5.9	98302		
74	Fosforybulokinaza	<i>Triticum aestivum</i>	7,77E-03	1.116	0.713	0.6	WZROST	PMF	201	55	5.7	45512	5.2	49203	KPPR_WHEAT	

75	Niezidentyfikowane		2,81E-04		0.059		WZROST						6.5	17868		
76	Translacyjnie kontrolowane bialko nowotworu	<i>Hordeum vulgare</i>	2,25E-03	0.021	0.052	2.5	WZROST	MS/MS	118	13	4.5	18929	4.6	26718	TCTP_HORVU	A6
77	Niezidentyfikowane		1,30E-03	0.010	0.079	7.7	WZROST						5.0	24213		
78	Niezidentyfikowane	<i>Hordeum vulgare</i>	1,51E-04	0.031	0.086	2.7	WZROST	PMF	175	53	5.7	35765	6.1	43212	gi 326517467	
79	Bialko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego, izoforma	<i>Hordeum vulgare</i>	9,73E-05	0.007	0.042	5.8	WZROST	PMF	80	19	5.1	73301	5.2	86317	gi 326495158	K5
80	Niezidentyfikowane		4,73E-03		0.051		spadek						5.0	15064		
81	Niezidentyfikowane		1,08E-03		0.019		spadek						4.9	17080		
82	Niezidentyfikowane		9,40E-04		0.025		spadek						5.5	22070		
83	Niezidentyfikowane		2,84E-03		0.044		spadek						6.7	31241		C6
84	Syntaza cysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	2,39E-04		0.081		spadek	PMF	85	26	6.1	41129	5.1	41024	gi 326506704	
85	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	<i>Hordeum vulgare</i>	1,36E-03	0.024	0.048	2.0	WZROST	PMF	114	31	6.1	39064	6.8	48742	gi 226316443	C7
86	Niezidentyfikowane		5,71E-03	0.027			spadek						5.4	37590		
87	Bialko zależne od pirofosforanu tiaminy	<i>Hordeum vulgare</i>	2,64E-04	0.010			spadek	PMF	118	34	5.5	74032	5.5	89697	gi 326533372	
88	Niezidentyfikowane		1,05E-05	0.023	0.005	0.2	WZROST						5.4	99788		
89	Bialko szoku cieplnego 70 kDa (chloroplastowe)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,43E-02	0.054	0.033	0.6	WZROST	MS/MS	121	3	6.0	72721	5.7	75478	HSP7M_PHAVU	C2

Tab 4.3. Białka, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Sebastian. Tabela w większej rozdzielczości jest dostępna na płycie CD.

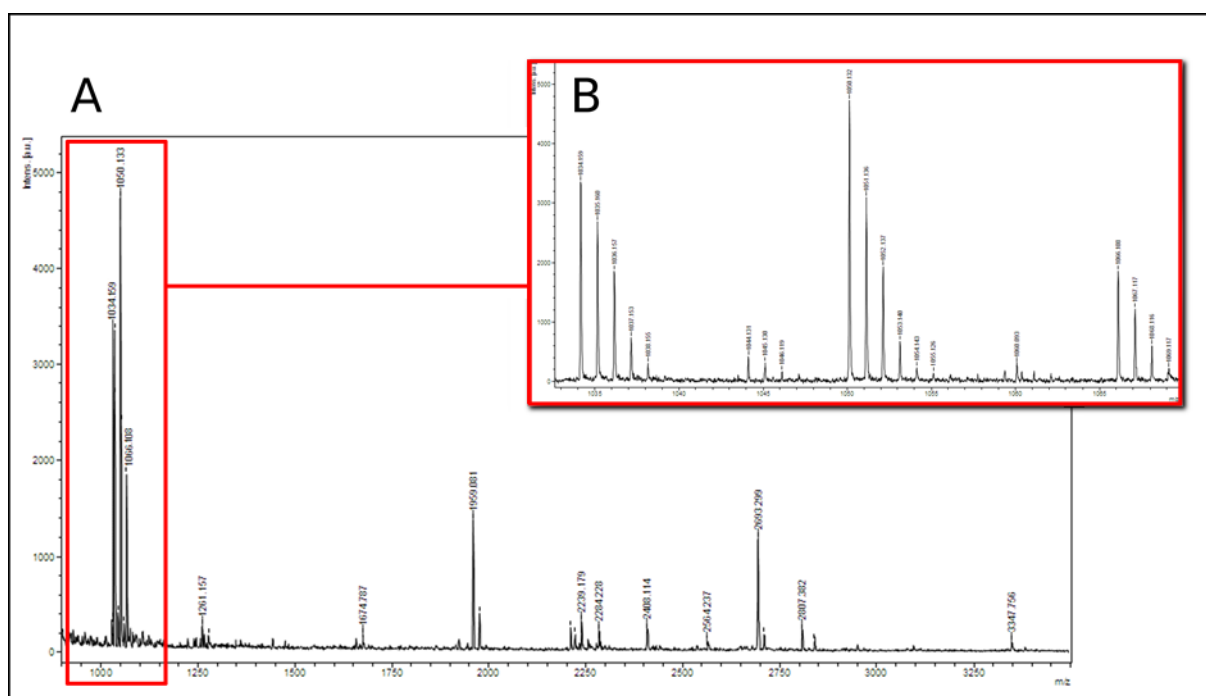
Nr plamki	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola [% objętościowy]	Susza [% objętościowy]	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT (p≤0,05)	% pokrycia sekwencji	pI (teoretyczne)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	pI (eksperymentalne)	Masa cząsteczkowa (eksperymentalna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Pozycja na żelu
1	Białko rybosomalne z rodziny L12	<i>Oryza sativa</i>	3,73E-04	0.153	0.019	0.13	spadek	MS/MS	271	17	5.2	18579	4.8	12990	RK12_ORYSJ	
2	Kompleks żelazowo-siarkowy cytochromu b6f	<i>Oryza sativa</i>	2,62E-03	0.162	0.102	0.63	spadek	MS/MS	67	35	9.6	24624	6.3	14400	gi 326518434	
3	Kompleks żelazowo-siarkowy cytochromu b6f	<i>Hordeum vulgare</i>	3,22E-02	0.034	0.017	0.51	spadek	MS/MS	47	5	9.7	24624	5.8	14776	gi 326518434	B1
4	Izomeraza peptydylowo-prolylowa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,21E-02	0.019	0.003	0.17	spadek	MS/MS	157	6	10.1	28516	6.9	16170	CP20B_ARATH	
5	Syntaza ATP, podjednostka alfa (mitochondrialna)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,04E-04	0.024	0.003	0.10	spadek	MS/MS	35	8	9.8	26362	5.6	29228	ATP0_ARATH	
6	Nieidentyfikowane		7,89E-03	0.051	0.124	2.42	WZROST						5.1	30575		
7	Nieorganiczna pirofosfataza	<i>Hordeum vulgare</i>	7,34E-03	0.028	0.014	0.50	spadek	MS/MS	46	5	5.8	24148	5.6	32125	IPR_HORVD	
8	Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksyalanu	<i>Vigna aconitifolia</i>	4,66E-03	0.024	0.006	0.26	spadek	MS/MS	33	1	6.6	73531	5.6	32534	P5CS_VIGAC	G4
9	C-końcowa hydrolaza ubikwityny 19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,56E-03	0.037	0.022	0.58	spadek	MS/MS	28	1	4.8	77097	5.2	34838	UBP19_ARATH	K1
10	Nieidentyfikowane		1,24E-02	0.038	0.016	0.42	spadek						5.6	38118		F3
11	Białko kompleksu wydzielającego tlen 1 (chloroplastowe)	<i>Solanum tuberosum</i>	4,32E-04	0.058	0.014	0.24	spadek	MS/MS	330	13	5.8	35595	5.3	39444	PSBO_SOLTU	G1
12	Białko biosyntezy pirydoksalu	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,14E-03	0.033	0.008	0.25	spadek	MS/MS	36	4	5.7	33126	6.2	40303	PDX11_ARATH	
13	Oksydoreduktaza NA DP+-ferredoksyna	<i>Hordeum vulgare</i>	3,76E-04	0.121	0.049	0.41	spadek	PMF	90	32	8.3	39971	6.4	40252	gi 326492141	K2
14	acetyltransferaz dihydrolipo-lizyny	<i>Hordeum vulgare</i>	3,99E-02	0.015	0.083	5.61	WZROST	MS/MS	29	1	5.3	68991	5.1	41495	OPD21_ARATH	
15	Syntaza cysteinowa	<i>Triticum aestivum</i>	2,66E-03	0.109	0.067	0.62	spadek	MS/MS	46	3	5.3	34207	5.3	41547	CYSK_WHEAT	G2
16	Białko związane z dynamią	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,21E-02	0.053	0.035	0.65	spadek	PMF	77	39	7.6	68384	5.8	48400	T47968	B2
17	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	<i>Hordeum vulgare</i>	1,35E-02	0.232	0.164	0.70	spadek	PMF	198	53	6.1	38102	6.4	48972	gi 326493652	B4
18	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,82E-02	0.681	0.443	0.65	spadek	MS/MS	121	3	9.8	40507	5.8	53672	G3PC_ARATH	B3
19	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego B (chloroplastowa)	<i>Hordeum vulgare</i>	5,06E-03	0.031	0.40	0.40	spadek	MS/MS	140	5	6.4	48086	5.7	56652	G3PB_ARATH	
20	Sulfurylaza ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	2,00E-03	0.044	0.013	0.29	spadek	PMF	102	31	6.0	39484	6.3	57863	gi 326530496	G3
21	Amoniakoliza fenylalaniny	<i>Bromheadia finlaysoniana</i>	4,15E-02	0.074	0.049	0.67	spadek	MS/MS	39	2	7.1	76605	5.0	66220	PALY_BROFI	J1
22	Enolaza	<i>Oryza sativa</i>	1,17E-02	0.238	0.154	0.65	spadek	MS/MS	94	32	5.3	48285	5.6	69732	ENO_ORYSJ	I1
23	Syntaza ATP, podjednostka beta (chloroplastowa)	<i>Aegilops columnaris</i>	4,04E-04	0.474	0.232	0.49	spadek	MS/MS	489	14	5.0	53865	5.4	69849	ATPB_AEGCO	
24	Syntaza ATP, podjednostka beta (chloroplastowa)	<i>Aegilops columnaris</i>	2,57E-02	0.094	0.028	0.30	spadek	MS/MS	150	7	5.0	53865	5.4	71856	ATPB_AEGCO	
25	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Triticum aestivum</i>	9,63E-04	0.556	0.328	0.59	spadek	MS/MS	376	11	4.7	53721	5.3	75920	RUBB_SECCCE	I3
26	Reduktaza ferredoksyna-azotan (chloroplastowe)	<i>Oryza sativa</i>	2,28E-03	0.071	0.029	0.40	spadek	MS/MS	118	3	7.0	66671	6.3	77972	gi 326505210	I2
27	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,55E-03	0.100	0.034	0.34	spadek	MS/MS	109	5	4.9	71712	5.2	84186	HSP70_ARATH	
28	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Zea mays</i>	2,22E-03	0.082	0.134	1.63	WZROST	MS/MS	81	33	5.1	70871	5.2	85174	HSP70_MAIZE	
29	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka alfa	<i>Triticum aestivum</i>	1,49E-06		0.159		spadek	MS/MS	248	61	4.7	57656	4.9	76173	RUBA_WHEAT	
30	Nieidentyfikowane		7,19E-06	0.028			spadek						6.2	10039		
31	Nieidentyfikowane		2,20E-03	0.019			spadek						6.1	14967		
32	Nieidentyfikowane		7,97E-04	0.011			spadek						5.5	32288		F1
33	Białko rybosomalne 30S z rodziny S8 (chloroplastowe)	<i>Liriodendron tulipifera</i>	4,23E-08	0.020			spadek	MS/MS	45	9	11.5	15269	5.5	40049	RR8_LIRTU	
34	Oksydoreduktaza NA DP+-ferredoksyna (chloroplastowe)	<i>Mesembryanthemum</i>	6,51E-06	0.037			spadek	MS/MS	111	5	9.2	41322	5.8	41812	FENR_MESKR	
35	Syntaza S-adenozylometioniny	<i>Triticum aestivum</i>	1,04E-05	0.031			spadek	MS/MS	118	6	5.5	43609	5.7	59778	METK_WHEAT	
36	Prawdopodobna transferaza galakturonianu	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,37E-03	0.011			spadek	MS/MS	31	2	9.8	61184	5.7	60363	GAUTC_ARATH	
37	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	1,57E-02	0.025			spadek	MS/MS	37	2	4.7	53721	5.3	74292	RUBB_SECCCE	
38	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	1,80E-05	0.031			spadek	MS/MS	244	8	4.7	53721	5.1	75289	RUBB_SECCCE	F4
39	Nieidentyfikowane		1,17E-03	0.020			spadek						5.5	79150		
40	Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu	<i>Medicago sativa</i>	3,76E-04	0.013			spadek	MS/MS	42	8	7.8	39458	6.5	89095	MTDH_MEDSA	
41	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	<i>Triticum aestivum</i>	8,05E-04		0.064		WZROST	MS/MS	274	10	8.6	47426	5.6	49551	RCAB_HORVU	K3
42	Nieidentyfikowane		6,88E-03	0.259	0.142	0.55	spadek						5.7	67809		
43	Nieidentyfikowane		2,02E-02	0.195	0.142	0.73	spadek						5.1	32409		
44	Białko opiekuńcze proteazy kazeino-litycznej (chloroplastowe)	<i>Medicago truncatula</i>	6,45E-03	0.092	0.059	0.63	spadek	PMF	145		6.4	102889	5.8	93196	gi 357520587	
45	Białko opiekuńcze proteazy kazeino-litycznej (chloroplastowe)	<i>Oryza sativa</i>	4,47E-02	0.041	0.029	0.71	spadek	PMF	233		6.1	101853	5.7	908543	CLPC1_ORYSJ	
46	Białko z rodziny 14-3-3	<i>Hordeum vulgare</i>	2,52E-02	0.072	0.011	0.15	spadek	MS/MS	104	51	4.7	29448	4.9	35823	1433A_HORVU	
47	Białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego	<i>Solanum lycopersicum</i>	3,90E-04	0.008	0.023	2.86	WZROST	MS/MS	90	4	5.0	73475	5.3	86300	BIP_SOLLIC	K4
48	Białko wiążące światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego 2	<i>Zea mays</i>	7,70E-04	0.013	0.038	2.90	WZROST	PMF	82	26	5.0	73211	5.2	86317	BIP2_MAIZE	K5

Tab 4.4. Białka, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Stratus. Tabela w większej rozdzielczości jest dostępna na płycie CD.

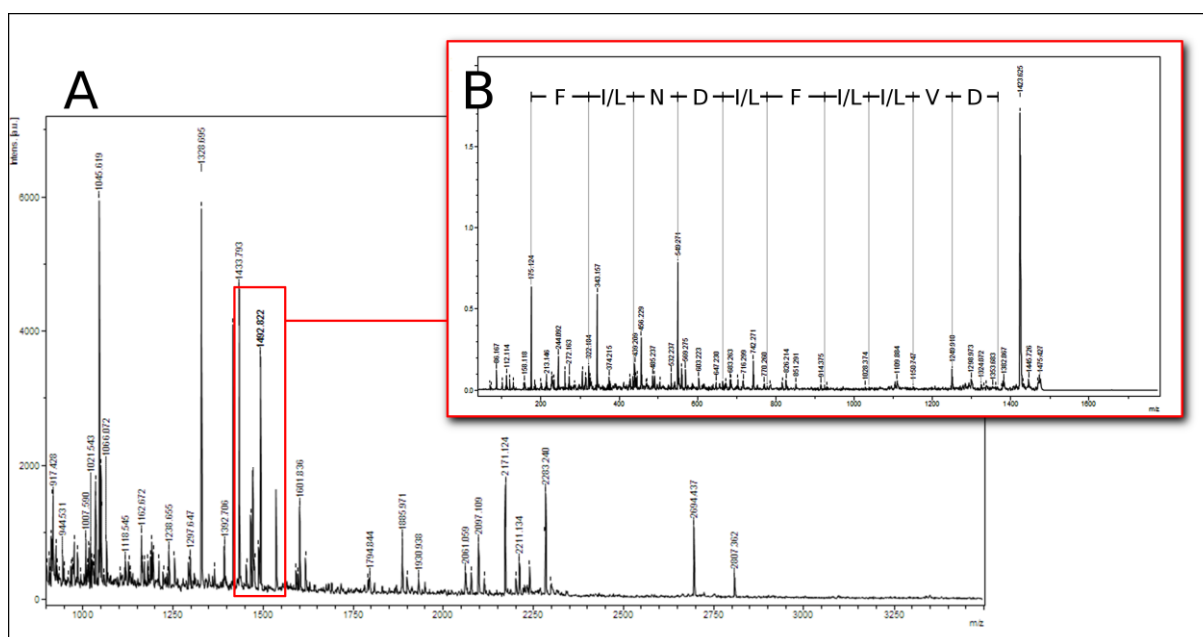
Nr plamki	Nazwa białka	Organizm	p-wartość	Kontrola [% objętościowy]	Susza [% objętościowy]	Susza/Kontrola	Zmiana profilu akumulacji	Metoda identyfikacji	Punkty z MASCOT (p<0,05)	% pokrycia sekwencji	pI (teoretyczne)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	pI (eksperymentalne)	Masa cząsteczkowa (eksperymentalna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Pozycja na żelu
1	Białko rybosomalne 50S z rodziny L12	<i>Secale cereale</i>	7,26E-05	0.024			spadek	MS/MS	57	5	5.5	18264	4.9	14308	RK12 SECCE	
2	Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu	<i>Maedicago sativa</i>	3,63E-04	0.057			spadek	MS/MS	39	18	7.8	39458	5.8	14919	MTDH MEDSA	
3	Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu	<i>Maedicago sativa</i>	1,26E-03	0.050	0.015	0.31	spadek	MS/MS	30	2	7.8	39458	4.7	20707	MTDH MEDSA	A3
4	Kompleks żelazowo-siarkowy cytochromu b6f	<i>Hordeum vulgare</i>	3,31E-04	0.028			spadek	MS/MS	47	5	9.7	24624	5.3	25881	gii326518434	
5	Peroksyredoksyna dwucysteinowa	<i>Hordeum vulgare</i>	2,49E-02	0.127	0.037	0.29	spadek	PMF	82	40	5.4	23398	4.8	27266	BAS1 HORVU	C5
6	Syntaza celulozy	<i>Oryza sativa</i>	8,46E-04	0.206	0.111	0.54	spadek	MS/MS	55	2	6.5	128295	4.2	30038	CSLD3 ORY SJ	
7	Niezidentyfikowane		1,78E-04	0.049			spadek						4.6	30460		
8	Białko rozpoznające sekwencję sygnałną	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,70E-03	0.080	0.024	0.30	spadek	MS/MS	29	1	9.7	53257	5.1	31162		A4
9	Niezidentyfikowane		1,16E-03	0.079	0.040	0.51	spadek	MS/MS	45	16	5.1	12535	5.3	31202	UMEC ARMUR	
10	Niezidentyfikowane		9,53E-06	0.026			spadek						5.5	32247		F1
11	Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu	<i>Vigna acconitifolia</i>	1,81E-03	0.039	0.011	0.29	spadek	MS/MS	33	1	6.6	73531	5.6	32575	P5CS VIGAC	G4
12	Prawdopodobna transferaza galakturonianu	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,64E-04	0.040			spadek	MS/MS	38	2	9.8	61184	5.2	32907	GAUTC ARATH	
13	Flawoproteina przenosząca elektrony	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,67E-04	0.044	0.025	0.56	spadek	MS/MS	31	2	6.6	38612	4.9	34443	ETFA ARATH	
14	C-końcowa hydrolaza ubikwityny 19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,03E-03	0.049	0.012	0.25	spadek	MS/MS	28	1	4.8	77097	5.2	34838	UBP19 ARATH	K1
15	Białko z rodziny 14-3-3	<i>Hordeum vulgare</i>	5,56E-04	0.111	0.023	0.21	spadek	MS/MS	104	51	4.7	29448	4.9	35823	1433A HORVU	
16	Niezidentyfikowane		7,33E-03	0.054	0.023	0.43	spadek						5.6	38069		F3
17	Reduktaza enolizacji ACP	<i>Brassica napus</i>	2,22E-02	0.025	0.009	0.37	spadek	MS/MS	30	3	9.4	40625	5.6	39394	FAB1 BRANA	
18	Białko kompleksu wydzielającego tlen 1 (chloroplastowe)	<i>Solanum tuberosum</i>	1,76E-03	0.080	0.030	0.37	spadek	MS/MS	330	13	5.8	35595	5.3	39344	PSBO SOLTU	G1
19	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Hordeum vulgare</i>	5,22E-03	0.119	0.044	0.37	spadek	PMF	90	32	8.3	39971	6.4	40150	2-gi-326492141	K2
20	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	<i>Mesembryanthemum</i>	9,87E-03	0.229	0.143	0.62	spadek	MS/MS	53	2	9.2	41322	5.8	40869	FENR MESCR	A5
21	Białko ARABIDILLO 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,81E-03	0.160	0.069	0.43	spadek	MS/MS	51	1	6.0	101833	5.7	41233	ADLO1 ARATH	
22	Syntaza cysteinowa (mitochondrialna)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,50E-04	0.124	0.067	0.54	spadek	MS/MS	38	2	9.3	46128	5.3	41547	CYSKM ARATH	G2
23	Epimeraza UDP-galaktozy	<i>Hordeum vulgare</i>	6,01E-03	0.349	0.261	0.75	spadek	PMF	179	42	7.1	41582	6.0	45962	gii326523629	A1
24	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Hordeum vulgare</i>	2,58E-03	0.300	0.154	0.51	spadek	MS/MS	118	39	8.9	51383	5.4	48742	RCAA HORVU	
25	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Hordeum vulgare</i>	1,84E-02	0.058	0.029	0.50	spadek	MS/MS	323	11	8.9	51383	4.7	48972	RCAA HORVU	
26	Niezidentyfikowane		2,06E-06	0.050			spadek						5.6	50136		
27	Kinaza fosfoglicocynianowa	<i>Triticum aestivum</i>	3,31E-04	0.090	0.057	0.63	spadek	MS/MS	90	4	5.5	42153	6.0	49901	PGK1 WHEAT	
28	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Triticum aestivum</i>	1,18E-03	0.055	0.025	0.44	spadek	MS/MS	72	8	6.3	48079	5.9	51691	RCA MAIZE	
29	Białko naprawcze DNA (UVH3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,73E-04	0.040	0.017	0.42	spadek	MS/MS	51	1	4.7	166079	6.2	53295	UVH3 ARATH	
30	Białko z rodziny transporterów ABC (16)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,64E-03	0.236	0.197	0.84	spadek	MS/MS	36	1	9.1	136798	5.7	54562	AB16B ARATH	
31	Sulfurylaza ATP	<i>Hordeum vulgare</i>	4,10E-03	0.040	0.014	0.34	spadek	PMF	102	31	6.0	39484	6.3	57456	gii326530496	G3
32	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	<i>Hordeum vulgare</i>	3,02E-02	0.064			spadek	MS/MS	94	3	8.9	51383	5.2	58409	RCAA HORVU	
33	Niezidentyfikowane		6,27E-03	0.038	0.016	0.42	spadek						5.8	58961		
34	Czynnik inicjacji translacji 4A	<i>Oryza sativa</i>	2,41E-03	0.056	0.034	0.61	spadek	MS/MS	81	27	5.3	46849	5.5	64316	IF4A1 ORY SJ	
35	Proteaza Do-like 7	<i>A. thaliana</i>	4,23E-03	0.042	0.024	0.57	spadek	MS/MS	41	1	5.7	120543	5.6	64771	DEGP7 ARATH	
36	Amoniakolizacja fenylalaniny	<i>Bromheadia finlaysoniana</i>	5,70E-04	0.092	0.043	0.47	spadek	MS/MS	39	2	7.1	76605	5.1	65845	PALY BROFI	J1
37	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	2,04E-04	0.036			spadek	MS/MS	58	19	4.7	53721	5.0	72458	RUBB SECCE	
38	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	<i>Secale cereale</i>	4,05E-04	0.024			spadek	MS/MS	230	8	4.7	53721	5.1	75039	RUBB SECCE	F4
39	Niezidentyfikowane		6,45E-05	0.013			spadek						6.6	77842		
40	Izomeraza disiarczkowa	<i>Hordeum vulgare</i>	1,96E-02	0.041	0.014	0.35	spadek	MS/MS	124	27	4.9	56656	5.0	79018	PDI HORVU	
41	Zależna od ATP metaloproteaza cynkowa	<i>Capsicum annuum</i>	3,28E-03	0.033	0.008	0.24	spadek	MS/MS	27	2	6.6	71245	5.3	84186	FTSH CAPAN	
42	Peroksydaza 10	<i>Arahis hypogaea</i>	1,55E-02	0.064	0.019	0.29	spadek	MS/MS	52	30	6.2	38462	5.0	91655	EFGC ARAHY	
43	Białko opiekujące proteazę kazeino-itycznej	<i>Oryza sativa</i>	2,82E-02	0.033	0.011	0.33	spadek	PMF	233	30	6.1	101853	5.6	93507	CLPC1 ORY SJ	A2
44	Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu	<i>Maedicago sativa</i>	1,33E-02	0.011	0.034	3.05	WZROST	MS/MS	43	8	7.8	39458	5.8	18100	MTDH MEDSA	
45	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	<i>Triticum aestivum</i>	1,16E-04	0.028	0.140	4.99	WZROST	MS/MS	97	33	8.6	47426	5.6	49551	RCAB HORVU	K3
46	Białko rybosomalne 10S (mitochondrialne)	<i>Pisum sativum</i>	7,72E-03	0.050	0.018	0.36	spadek	MS/MS	36	8	10.7	13476	5.3	40869	RT10 PEA	
47	Syntaza S-adenozylometioniny 3	<i>Brassica rapa</i>	7,69E-06	0.045			WZROST	MS/MS	86	3	5.6	43556	5.7	58135	METK BRARP	
48	Enzym biosyntezy tiazolu (chloroplastowy)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,25E-02	0.047			spadek	MS/MS	73	3	5.8	36755	5.3	40714	TH4 ARATH	
49	RuBisCO, duża podjednostka	<i>Hordeum vulgare</i>	1,94E-02	0.079	0.205	2.61	WZROST	MS/MS	346	8	6.2	53672	5.8	56987	RBL HORVU	
51	Białko szoku cieplnego 70 kDa	<i>Hordeum vulgare</i>	3,36E-03	0.307	0.097	0.32	spadek	PMF	94	32	5.0	73955	5.5	67509	gii326492960	
52	Białko opiekujące proteazę kazeino-itycznej	<i>Medicago truncatula</i>	6,88E-02	0.069	0.035	0.51	spadek	PMF	145	45	6.4	102889	5.2	109745	gii357520587	
53	Homolog kontrolowanego transkrypcyjnie białka nowotworu	<i>Hordeum vulgare</i>	6,21E-03	0.067	0.023	0.35	spadek	MS/MS	118	13	4.5	18929	4.6	26718	TCTP HORVU	A6
54	Białko wiążące światła (wewnętrzna) retikulum endoplazmatycznego	<i>Solanum lycopersicum</i>	4,36E-02	0.012	0.024	1.90	WZROST	MS/MS	82	26	5.0	73475	5.3	86300	BIP SOLLC	K4
55	Białko wiążące światła (wewnętrzna) retikulum endoplazmatycznego 2	<i>Zea mays</i>	6,89E-03	0.019	0.059	3.19	WZROST	PMF	96	29	5.0	73211	5.2	86317	BIP2 MAIZE	K5

Analizy wykonane metodami spektrometrii mas MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF umożliwiły identyfikację ok. 80% białek różnicujących (tab.4.1-4). Wykorzystanie wysokorozdzielczego analizatora czasu przelotu pozwoliło na obserwację rozkładu monoizotopowego mas peptydów na widmie (ryc. 4.3.), a proces fragmentacji wybranych peptydów pozwolił w wielu przypadkach na ustalenie częściowej sekwencji aminokwasowej (ryc. 4.4.), co przełożyło się na identyfikację większej liczby białek w bazach danych.

Największa liczba białek, których poziom akumulacji zmienił się w roślinach wzrastających w warunkach niedoboru wody została wykryta w odmianie Maresi – 81 białek różnicujących, natomiast w Cam/B1/CI susza spowodowała najmniejsze zmiany w profilach akumulacji białek – 41 białek różnicujących. W odmianie Stratus wykryto 54 białka różnicujące, a w Sebastianie 48 białek charakteryzowało się zmienionym profilem akumulacji w suszy (tab.4.5). Dla trzech odmian: Maresi, Stratus, Sebastian większość białek różnicujących wykazywała spadek w profilu akumulacji, jedynie w Cam/B1/CI więcej białek charakteryzowało się zwiększonym profilem akumulacji w suszy (ryc.4.5., tab.4.5.). Zidentyfikowane białka zostały pogrupowane na podstawie pełnionych przez nie funkcji biologicznych (ryc.4.6.).



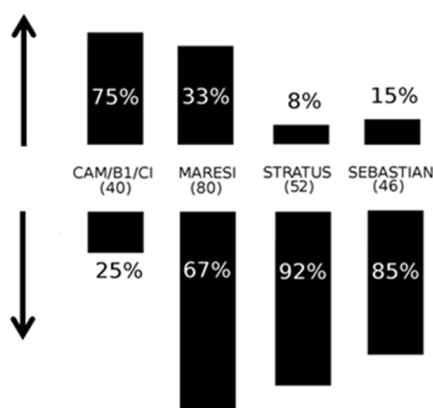
Ryc.4.3. Widmo oksydoreduktazy NADP⁺: ferredoksyna (A) oraz rozkład monoizotopowy dla peptydów o masach $[M+H]^+$ 1034.159 Da, 1050.132 Da i 1066.108 Da (B).



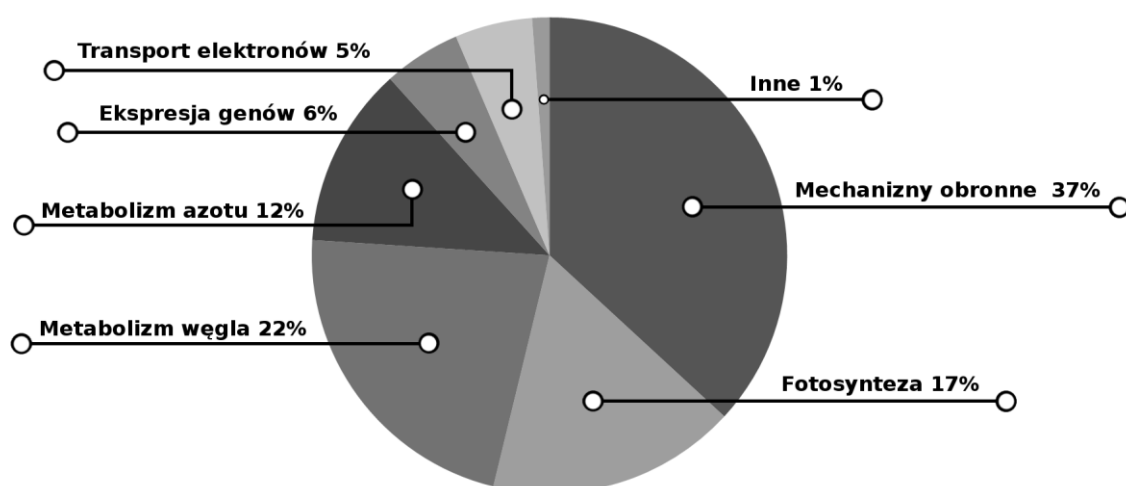
Ryc. 4.4. Widmo podjednostki β syntazy ATP (A) oraz widmo fragmentacyjne peptydu o masie $[M+H]^+$ 1492.882 Da (k.QDVLLFIDNIFR.d) z częściowo ustaloną sekwencją aminokwasową (B).

Tab. 4.5. Liczba białek reagujących na suszę w liściach czterech badanych genotypów.

	Cam/B1/CI	Maresi	Stratus	Sebastian
Białka reagujące na suszę	41	82	54	48
Białka zidentyfikowane	32	54	47	40
Wzrost akumulacji	31	28	6	6
Spadek akumulacji	10	54	48	42
Białka wykryte tylko w roślinach kontrolnych	1	14	11	11
Białka wykryte tylko w roślinach poddanych działaniu suszy	7	6	1	2



Ryc. 4.5. Procentowe zmiany profilu akumulacji białek badanych odmian, ↑ - wzrost akumulacji, ↓ - spadek akumulacji.



Ryc. 4.6. Klasyfikacja białek zidentyfikowanych w liściach badanych genotypów.

Białka, które wykazywały spadek w profilu akumulacji w porównaniu do roślin kontrolnych były głównie związane z fotosyntezą, metabolizmem azotu oraz węgla (glikoliza, cykl kwasów trikarboksylowych). Z kolei białka, których poziom akumulacji wzrastał w suszy były związane z mechanizmami obronnymi. Wśród nich zidentyfikowano m.in. białka szoku cieplnego, białka związane z osmoregulacją oraz zaangażowane w usuwanie wolnych rodników (tab.4.6.).

Tab.4.6. Liczba białek zidentyfikowanych w liściach badanych genotypów jęczmienia. Białka o zwiększonym profilu akumulacji (↑) i zmniejszonym (↓) zostały sklasyfikowane na podstawie przypuszczanych funkcji pełnionych w procesach biologicznych.

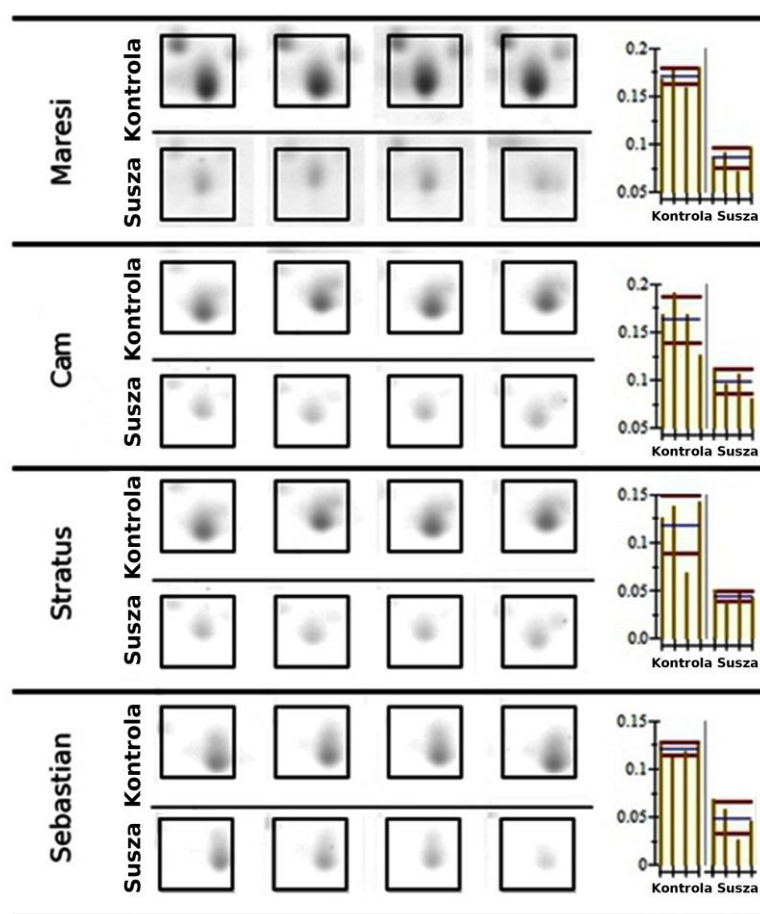
	MARESI		CAM/B1/CI		STRATUS		SEBASTIAN	
Mechanizmy obronne (63)	8↑	11↓	12↑	4↓	2↑	14↓	3↑	9↓
Fotosynteza (29)	3↑	5↓	2↑	3↓	2↑	2↓	1↑	11↓
Metabolizm węgla (38)	3↑	10↓	6↑	1↓	1↑	12↓	-	5↓
Metabolizm azotu (21)	1↑	7↓	2↑	1↓	1↑	3↓	1↑	5↓
Ekspresja genów (9)	1↑	2↑	-	1↓	-	3↓	-	2↓
Transport elektronów (9)	-	1↑	-	-	-	5↓	-	3↓
Inne (2)	-	-	-	-	-	2↓	-	-
Suma (171)	16↑	36↓	22↑	10↓	6↑	41↓	5↑	35↓

Analiza porównawcza badanych genotypów dla białek, których profil akumulacji zmienił się pod wpływem suszy w przynajmniej dwóch genotypach ujawniała silnie konserwatywną odpowiedź pomiędzy badanymi odmianami (tab. 4.7.). Przykładowy profil zmian poziomu akumulacji białka, które zareagowało w każdej z badanych odmian – oksydoreduktazy NADP^+ : ferredoksyna (pozycja K2 na ryc. 4.1 i w tab. 4.7) został przedstawiony na rycinie 4.7.

Tab. 4.7. Białka liścia, które wykazywały zmiany w profilu akumulacji w suszy w przynajmniej dwóch odmianach. Skala kolorów wskazuje na poziom zmiany białek indukowanych suszą w stosunku do roślin kontrolnych. Białka zostały pogrupowane zgodnie z ilością genotypów, w których poziom akumulacji białka uległ zmianie: A – Maresi-Stratus, B – Maresi-Sebastian, C – Maresi-Cam/B1/CI, F – Stratus-Sebastian, G – Maresi-Stratus-Sebastian, I – Maresi-Cam/B1/CI-Sebastian, J – Cam/B1/CI-Stratus-Sebastian, K – Maresi-Cam/B1/CI-Stratus-Sebastian. Pozycje białek (A1-K5) zostały naniesione na ryc. 4.1.

Białko	Maresi	Cam/B1/CI	Stratus	Sebastian	Pozycja	Funkcja
Epimeraza UDP-galaktozy					A1	Metabolizm węgla
Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu					A3	
Dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego					B3	
Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu					B4	
					C7	
Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco					F4	
					I3	
Enolaza					I1	Mechanizmy obronne
Aktywaza Rubisco, izoforma B					K3	
Białko opiekuńcze kazeino-litycznej proteazy serynowej					A2	
Homolog translacyjnie kontrolowanego białko nowotworu					A6	
					C2	
Białko szoku cieplnego, 70 kDa					C3	
S-transferaza glutationu					C4	
Peroksyredoksyna dwu-cysteinowa					C5	
Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu					G4	
Amoniakoliza fenylalaniny					J1	
C-końcowa hydrolaza ubikwityny					K1	Fotosynteza
Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego					K4	
Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego 2					K5	
Cytochrom b6f, kompleks Fe-S					B1	
Oksydoreduktaza NADP ⁺ : ferredoksyna					A5	
Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II					G1	Metabolizm azotu
Syntetaza glutaminowa					C1	
Syntaza cysteinowa					G2	
Reduktaza ferredoksyna-azotyn					I2	Inne
Białko podobne do dynaminy					B2	
Sulfurylaza ATP					G3	
Białko rozpoznające sekwencję sygnałną					A4	
Niezidentyfikowane					C6	
Niezidentyfikowane					F1	
Niezidentyfikowane					F3	





Ryc. 4.7. Zmiana (spadek) profilu akumulacji białka biorącego udział w transporcie elektronów w fazie jasnej fotosyntezy – oksydoreduktazy NADP^+ : ferredoksyna (K2) w odmianach rodzicielskich i referencyjnych.

Zastosowane w doświadczeniu warunki niedoboru wody w znacznym stopniu wpłynęły na procesy związane z metabolizmem węgla badanych odmian jęczmienia. Profil akumulacji jednej ze zidentyfikowanych izoform aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu uległ zmniejszeniu w Sebastianie (Sb-17) i Maresi (M-39). Natomiast w Cam/B1/CI (C-26) i Maresi (M-85) inna izoforma tego białka była obecna w większych ilościach w roślinach poddanych suszy. Poziom akumulacji innych białek biorących udział w glikolizie również się zmienił pod wpływem niedoboru wody. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (C-36; M-41; Sb-11, 98 – izoforma) charakteryzowała się zwiększoną ilością w liściach roślin poddanych suszy tylko w odmianie Cam/B1/CI. Kinaza fosfoglicerynianowa została zidentyfikowana tylko w przypadku odmiany Stratus (St-27) jako białko różnicujące rośliny kontrolne i poddane działaniu suszy. Podobny profil akumulacji wykazywała enolaza,

przedostatni enzym szlaku glikolitycznego (C-17; M-50; Sb-22). Wzrost ilości tego białka w suszy był obserwowany tylko w odmianie Cam/B1/CI. 4-epimeraza UDP-galaktozy została zidentyfikowana w odmianach Maresi (M-35) i Stratus (St-23), gdzie charakteryzowała się obniżonym profilem akumulacji w roślinach stresowanych niedoborem wody. Prawdopodobna dehydrogenaza mannitolu, regulująca ilość mannozy w roślinie, została zidentyfikowana w trzech odmianach (M-6; Sb-40; St-2, 3, 44) jako białko różnicujące się w suszy. W przypadku jednej izoformy tego białka w Stratusie (St-44) oraz Maresi obserwowany był wzrost poziomu akumulacji. Natomiast w Sebastianie i pozostałych izoformach zidentyfikowanych w Stratusie (St-2, 3) białko to charakteryzowało się obniżonym poziomem akumulacji.

W odmianie Maresi duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) (M-48), kluczowego białka uczestniczącego w fotosyntezie, wykazywała spadek poziomu akumulacji, podczas gdy w odmianie Stratus został odnotowany wzrost ilości tego białka (St-49), a w dwóch pozostałych genotypach nie uległo ono znaczącym zmianom w porównaniu do roślin kontrolnych. Dwa dodatkowe białka związane z RuBisCO: izoformy aktywazy RuBisCO oraz białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO również posiadały zmieniony profil akumulacji w suszy. We wszystkich badanych odmianach izoforma B aktywazy RuBisCO wykazywała znaczny wzrost akumulacji w suszy (C-12; M-38; Sb-41; St-45), podczas gdy kilka wariantów izoformy A posiadało zmniejszony profil akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy (C-40; M-46; St-24, 25, 28, 32). Obniżenie poziomu akumulacji izoform białka wiążącego dużą podjednostkę RuBisCO było obserwowane we wszystkich analizowanych odmianach (C-48; M-51,53; Sb-25,37,38; St-37,38). Białka związane z centrami fotosyntetycznymi także zareagowały na suszę. Białko kompleksu wydzielającego tlen, składnik fotosystemu II, charakteryzowało się zmniejszonym poziom akumulacji w porównaniu do roślin kontrolnych (C-5; M-21,23; Sb-11; St-18). Zidentyfikowano także białka uczestniczące w transporcie energii i elektronów pomiędzy centrami fotosyntetycznymi: kompleks żelazowo-siarkowy cytochromu b6f (M-4; Sb-2 3; St-19) oraz izoformy oksydoreduktazy NADP^+ : ferredoksyna (C-6, 7; M-24, 25; Sb-13, 34; St-19, 20). W Sebastianie i Stratusie te białka były obecne w mniejszej ilości w porównaniu do roślin kontrolnych, natomiast w Maresi, jedynie oksydoreduktazy posiadały zmniejszony poziom akumulacji, podczas gdy zidentyfikowane kompleksy żelazo-siarkowe cytochromu b6f charakteryzowały się podwyższonym poziomem akumulacji. Z kolei w Cam/B1/CI jedna z izoform oksydoreduktaz uległa zwiększeniu, a u drugiej obserwowano zmniejszenie poziomu akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy.

Białka uczestniczące w procesach neutralizowania wolnych rodników również zostały zidentyfikowane jako różnicujące rośliny wzrastające w warunkach stresowych i kontrolnych. Większość z nich charakteryzowała się wzrostem w poziomie akumulacji w Cam/B1/CI i Maresi, natomiast w białkach liścia dwóch pozostałych odmian ich poziom nie ulegał znaczącym zmianom. Największa liczba zidentyfikowanych białek z tej kategorii była związana z cyklem glutationowo-askorbinianowym. Wzrost akumulacji peroksydazy askorbinianowej był obserwowany w Maresi (M-16) i Cam/B1/CI (C-46). Wzrost ilości reduktazy glutationowej był obserwowany tylko w Cam/B1/CI (M-18), podczas gdy w innych odmianach plamka reprezentująca to białko nie wykazywała istotnych zmian w intensywności na żelu. W linii hodowlanej Cam/B1/CI (C-38) zidentyfikowano białko o zwiększonym profilu akumulacji w suszy, biorące udział w metabolizmie kwasu askorbinowego – dehydrogenazę L-idonianową. Peroksyredoksyna dwu-cysteinowa, która bierze udział w usuwaniu nadtlenu wodoru, charakteryzowała się podwyższoną akumulacją w suszy w Cam/B1/CI (C-1) oraz Maresi (M-11), podczas gdy w Stratusie (St-5) obserwowany był spadek akumulacji tego białka. Inny enzym biorący udział w procesach detoksykacji, S-transferaza glutationowa, która sprzęga glutation z ksenobiotykami, wykazywała wzrost w profilu akumulacji w roślinach wzrastających w warunkach niedoboru wody w Cam/B1/CI (C-3) oraz Maresi (M-10, 18).

Enzymy uczestniczące w szlakach biosyntezy związków osmotycznie czynnych pod wpływem suszy wykazywały istotne zmiany ilościowe w porównaniu do roślin wzrastających w warunkach kontrolnych. Plamka na żelu, która została zidentyfikowana jako dehydrogenaza aldehydu betainowego, kluczowego enzymu biorącego udział w syntezie betainy wykazywała istotny wzrost intensywności w roślinach wzrastających w warunkach niedoboru wody jedynie w Cam/B1/CI (C-47), podczas gdy w pozostałych odmianach nie obserwowano znaczących różnic. Kluczowy enzym syntezy innego osmolitu – proliny, syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu w trzech odmianach (M-3, Sb-8, St-11) wykazywał spadki w poziomie akumulacji w roślinach poddanych suszy, z kolei w Cam/B1/CI nie obserwowano znaczących różnic w stosunku do roślin kontrolnych.

Białka szoku cieplnego stanowiły grupę białek, które wyraźnie zareagowały na suszę. Wśród wszystkich badanych genotypów, największe spadki poziomu akumulacji izoform białka szoku cieplnego o masie 70 kDa (HSP70) były obserwowane w Cam/B1/CI (C-23, 24, 28, 29), a także w Maresi (M-64, 79, 89). Natomiast w Sebastianie (Sb-27, 28) zmiany ilościowe izoform tego białka nie były jednolite, jedna z nich podlegała wzrostowi, a druga spadkowi. We wszystkich badanych odmianach zidentyfikowano izoformy białka wiążącego

światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego (C-50, 51; M-7, 79; Sb-47,48; St-54, 55), które znacznie zwiększyły swój profil akumulacji w suszy, zwłaszcza w Cam/B1/CI oraz Maresi. W klasie białek szoku cieplnego o masie 100 kDa (HSP100) zidentyfikowano białka biorące udział w degradacji źle ufałdowanych białek. Białko opiekuńcze kazeino-litycznej proteazy serynowej ClpC (ang. *caseino-lytic protease chaperone*) zidentyfikowane w Maresi (M-69, 70), Sebastianie (Sb-44, 45) i Stratusie (St-43, 52), we wszystkich przypadkach uległo obniżeniu w poziomie akumulacji. Natomiast sama proteaza kazeino-lityczna ClpP (ang. *caseino-lytic protease*) wykazywała różnice w profilu akumulacji pomiędzy Cam/B1/CI (C-44, 49), gdzie obserwowany był jej wzrost w suszy oraz Maresi (M-71, 72), w którym widoczny był spadek względnej ilości tego białka.

W każdej z badanych odmian zidentyfikowano również inne białko, które bierze udział w regulacji procesu degradacji białek, C-końcową hydrolazę ubikwityny (C-4, M-19, St-14, Sb-9), która w trzech badanych odmianach charakteryzowała się obniżonym poziomem akumulacji, natomiast w Cam/B1/CI obserwowano wzrost względnej ilości tego białka w roślinach poddanych działaniu suszy. Ponadto w Stratusie zidentyfikowano zależną od ATP metaloproteazę cynkową (St-41), która również charakteryzowała się obniżonym profilem akumulacji w suszy. Innymi białkami pełniącymi funkcje m.in. w fałdowaniu białek, które zareagowały na suszę były: izomeraza disiarczkowa (St-40) oraz izomeraza peptydylowo-prolylowa (Sb-4). Poziom akumulacji tych białek zmniejszył się wyraźnie pod wpływem suszy.

Białko rozpoznające sekwencję sygnałną białek i uczestniczące w ich kierowaniu do retikulum endoplazmatycznego zostało zidentyfikowane w Maresi (M-15), jako białko o obniżonej ilości względnej w stosunku do roślin kontrolnych, natomiast w Stratusie (St-8) obserwowano wzrost akumulacji tego białka.

Białka związane z syntezą niektórych aminokwasów: syntaza cysteinowa (M-28, 30, 84; Sb-15, St-22), syntaza metioninowa (M-67), syntaza S-adenozylometioninowa (M-47, Sb-35, St-47) w przeważającej części ulegały spadkowi w profilu akumulacji we wszystkich badanych odmianach oprócz Cam/B1/CI, w którym nie obserwowano istotnych zmian poziomu akumulacji dla tych białek. Ponadto w Cam/B1/CI zidentyfikowano dwa inne enzymy zaangażowane w syntezę aminokwasów, które jako substrat wykorzystują glutaminę: dehydrogenazę glutaminianową (C-16) i syntetazę glutaminianową (C-39), które wykazywały zwiększony poziom akumulacji w porównaniu do roślin kontrolnych. Syntetaza glutaminowa została również zidentyfikowana Maresi (M-42), ale względna jej ilość była mniejsza w roślinach poddanych działaniu suszy w porównaniu do kontrolnych. Innym białkiem

zaangażowanym w metabolizm azotu, którego poziom akumulacji uległ zmniejszeniu pod wpływem suszy w trzech spośród badanych genotypów była reduktaza ferredoksyna-azotyn (C-21, M-56, 57, Sb- 26).

Różne podjednostki enzymu biorącego udział w wytwarzaniu wysokoenergetycznego związku adenozylo-5'-trifosforanu (ATP) – syntazy ATP, pochodzenia mitochondrialnego i chloroplastowego, zostały zidentyfikowane w dwóch badanych genotypach: Cam/B1/CI (C-20) oraz Sebastianie (Sb-5, 23, 24), jako białka różnicujące rośliny kontrolne od roślin wzrastających w warunkach niedoboru wody. W Sebastianie wszystkie znalezione na żelach plamki reprezentujące podjednostki syntazy ATP zmniejszyły swoją intensywność, natomiast w Cam/B1/CI podjednostka α tego białka zwiększyła poziom akumulacji w suszy.

Enzym biorący udział w asymilacji siarki- sulfurylaza ATP, w trzech odmianach (oprócz Cam/B1/CI) wykazywała obniżenie poziomu akumulacji w porównaniu do roślin kontrolnych.

W odmianach Maresi, Sebastian i Stratus zidentyfikowano białka uczestniczące w syntezie polimerów ścian komórkowych: syntazę celulozy (St-6) oraz prawdopodobną transferazę galakturonianu (Sb-36; St-12), których akumulacja znacznie spadła w roślinach wzrastających w warunkach stresu.

Zidentyfikowano również kilka białek rybosomalnych (M-9; Sb-1, 33; St-1, 46). Ich względna ilość obniżyła się w porównaniu do roślin kontrolnych, a także białka związane z ekspresją genów: czynnik elongacyjny Tu (M-45), czynnik inicjujący translację (St-34), a także białko naprawcze DNA (St-29), których poziom akumulacji również wykazywał tendencję spadkową w suszy. W Sebastianie oraz Stratusie zidentyfikowano również przedstawicieli białek regulatorowych z rodziny 14-3-3 (Sb-46, St-15), które w roślinach poddanych działaniu suszy wykazywały spadek akumulacji oraz homolog translacyjnie kontrolowanego białko nowotworu (M-76, St-53), które w odmianie Maresi ulegało znacznemu wzrostowi w poziomie akumulacji, natomiast w Stratusie to białko ulegało znacznemu spadkowi.

Amoniakoliza fenyloalaniny, kluczowe białko szlaku fenylopropanoidowego, w którym m.in. następuje synteza fenolowych metabolitów wtórnych, wykazywała obniżenie poziomu akumulacji w suszy w trzech badanych genotypach – Cam/B1/CI (C-15), Sebastian (Sb-21) oraz Stratus (St-36). Natomiast w Maresi nie obserwowano istotnej zmiany ilościowej dla tego białka.

4.2. Analiza proteomiczna populacji mapującej

Zmiany w profilu akumulacji białek były monitorowane w liściach populacji mapującej jęczmienia jarego (100 genotypów), stanowiących pokolenie F₈ rekombinacyjnych linii wsobnych uzyskanych techniką pojedynczego ziarna ze skrzyżowania genotypów rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI.

Analiza zmian proteomu populacji MCam została wykonana z wykorzystaniem jednowymiarowych oraz wielowymiarowych technik statystycznych w dwóch różnych podejściach metodycznych.

W pierwszym, profile akumulacji białek były porównywane w kolejnych liniach hodowlanych populacji MCam pomiędzy roślinami kontrolnymi i poddanymi działaniu suszy, co umożliwiło identyfikację białek, które istotnie różnicowały rośliny rosnące w różnych warunkach dostępności wody w poszczególnych genotypach. Drugie podejście stanowiła analiza niecelowana 100 genotypów populacji mapującej i dwóch odmian rodzicielskich wykonana na żelach referencyjnych uzyskanych w pierwszym podejściu, co pozwoliło na prześledzenie profili akumulacji białek we wszystkich badanych obiektach.

Analiza statystyczna (t-Student, p-wartość $\leq 0,05$) w programie Image Master Platinum 7.0 pozwoliła na wykrycie łącznie we wszystkich 100 analizowanych genotypach 1738 białek różnicujących proteom liścia w warunkach suszy, dla których 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 przeważnie odpowiadało przynajmniej dwukrotnej zmianie w poziomie akumulacji w stosunku do kontroli.

W 21 genotypach zidentyfikowano od 3 do 10 białek różnicujących. Największa liczba genotypów (47) charakteryzowała się zmienionym profilem akumulacji dla 11-20 białek. W 25 różnice pomiędzy suszą i kontrolą zawierały się w przedziale 21-30 białek, natomiast najmniejsza liczba genotypów (6) charakteryzowała się największym poziomem zmian i zawierała się w przedziale 31-40 białek (tab. 4.8.). Około 70% wszystkich białek różnicujących wykazywało wzrost poziomu akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy, a 30% ulegało spadkowi (tab. 4.9.).

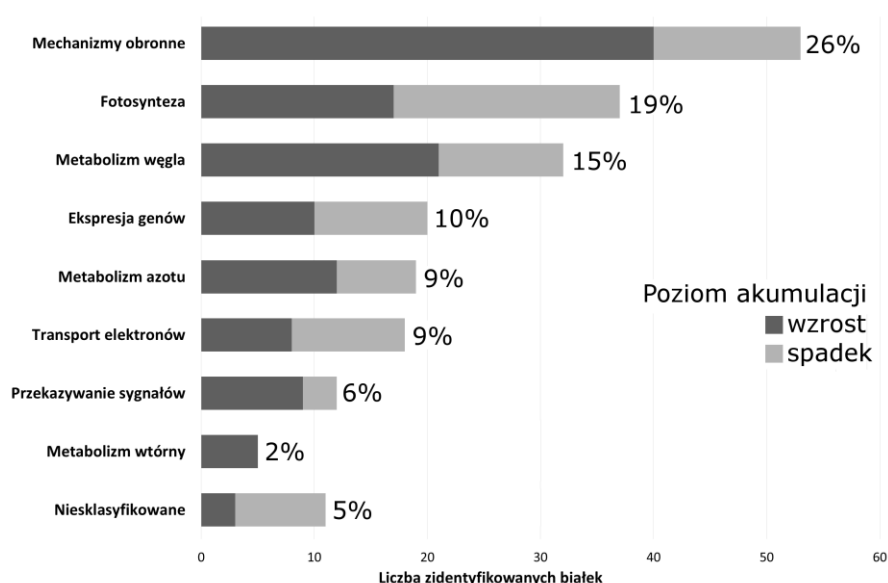
Tab. 4.8. Liczba białek różnicujących w poszczególnych genotypach populacji MCam. Kolorem żółtym zaznaczono genotypy, na podstawie których identyfikowano białka metodami spektrometrii mas.

Liczba białek różnicujących	3-10	11-20		21-30	31-40
Liczba genotypów	22	47		25	6
Numeracja genotypów	MCam_001	MCam_002	MCam_076	MCam_006	MCam_007, MCam_094, MCam_104, MCam_108, MCam_115, MCam_116
	MCam_014	MCam_004	MCam_078	MCam_008	
	MCam_021	MCam_005	MCam_081	MCam_019	
	MCam_024	MCam_009	MCam_086	MCam_026	
	MCam_041	MCam_010	MCam_087	MCam_029	
	MCam_042	MCam_017	MCam_088	MCam_035	
	MCam_044	MCam_027	MCam_089	MCam_039	
	MCam_052	MCam_028	MCam_090	MCam_048	
	MCam_071	MCam_043	MCam_092	MCam_050	
	MCam_074	MCam_045	MCam_093	MCam_056	
	MCam_075	MCam_046	MCam_099	MCam_058	
	MCam_077	MCam_049	MCam_101	MCam_059	
	MCam_079	MCam_053	MCam_102	MCam_063	
	MCam_080	MCam_057	MCam_103	MCam_073	
	MCam_085	MCam_060	MCam_109	MCam_082	
	MCam_091	MCam_061	MCam_111	MCam_084	
	MCam_105	MCam_065	MCam_113	MCam_096	
	MCam_106	MCam_066	MCam_120	MCam_097	
	MCam_107	MCam_067	MCam_121	MCam_100	
	MCam_119	MCam_068	MCam_122	MCam_110	
	MCam_124	MCam_069	MCam_123	MCam_112	
	MCam_128	MCam_070	MCam_126	MCam_114	
		MCam_072	MCam_127	MCam_118	
			MCam_130	MCam_125	
				MCam_129	

Tab. 4.9. Ogólny profil zmian poziomu akumulacji białek różnicujących rośliny kontrolne od roślin wzrastających w warunkach niedoboru wody we wszystkich liniach populacji mapującej.

Liczba białek różnicujących	1738	
Wzrost poziomu akumulacji	1081	70%
Spadek poziomu akumulacji	657	30%

Do identyfikacji białek różnicujących metodami spektrometrii mas wybrano łącznie 43 linie badane hodowlane populacji mapującej. Dla genotypów charakteryzujących się zmiennością proteomu w przedziale 3-10 oraz 11-20 białek do identyfikacji wzięto 25% genotypów z każdej z grupy, natomiast dla genotypów o większej zmienności proteomu identyfikowanych było 80% genotypów dla przedziału 21-30 białek różnicujących i 100% genotypów dla przedziału 31-40 białek różnicujących. Łącznie, identyfikacji podlegało ok. 1000 plamek reprezentujących rozdzielone białka. Analiza MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF pozwoliła na identyfikację łącznie ok. 500 białek, które zostały następnie pogrupowane ze względu na pełnione przez nie funkcje oraz zmianę poziomu akumulacji (ryc. 4.8.).



Ryc. 4.8. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek liści w populacji mapującej MCam z uwzględnieniem zmian w poziomie akumulacji białek. Wartości procentowe wskazują na udział każdej kategorii we wszystkich zidentyfikowanych białkach.

Największa liczba białek, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w porównaniu do roślin kontrolnych była związana z mechanizmami obronnymi. Większość białek zidentyfikowanych w tej kategorii (75%) zwiększyła swój poziom akumulacji w odpowiedzi na suszę. Enzymy zaangażowane w usuwanie wolnych rodników stanowiły ok. 30% białek tej kategorii i w przeważającej ilości (66%) wykazywały wzrost względnej ilości w porównaniu do roślin kontrolnych.

Susza wpłynęła także na białka związane z fotosyntezą (19%). Nieznaczna większość białek w tej kategorii (20) obniżyła swój poziom akumulacji w roślinach wzrastających w warunkach niedoboru wody.

Enzymy związane z metabolizmem węgla również uległy zmianom w poziomie akumulacji spowodowanych suszą, jednakże 65% z nich charakteryzowało się zwiększonym profilem akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy.

Niedobór wody spowodował zmiany akumulacji białek związanych z ekspresją genów (10%), z których połowa wykazywała obniżenie względnej ilości, metabolizmem azotu (9%), transportem elektronów (9%) i przekazywaniem sygnałów (6%).

Niewielka liczba zidentyfikowanych białek (5) była związana z metabolizmem wtórnym i w tej kategorii obserwowano zwiększenie względnej ilości tych białek w suszy.

Poziom zmian względnej ilości zidentyfikowanych białek w stosunku do kontroli wahał się od 2 do 15 razy w przypadku białek, których akumulacja zwiększyła się w suszy i od 2 do 10 razy dla białek, których akumulacja spadła w roślinach poddanych działaniu suszy (tab. 4.10. i 4.11.).

Białka, które w wyniku działania suszy zwiększyły swój poziom akumulacji ponad 10-krotnie stanowiły 3% wszystkich białek różnicujących. Białka, których profil akumulacji zmalał 5-10 krotnie stanowiły 1,7% wszystkich białek różnicujących, natomiast te, których względna ilość w stosunku do kontroli zwiększyła się w tym przedziale stanowiły 4,5%. 17,6% wszystkich białek różnicujących w populacji mapującej wykazywało zmianę na poziomie od 3 do 5 razy w stosunku do kontroli, z czego 5% stanowiły białka o zmniejszonym profilu akumulacji w suszy w tym zakresie. Białka, których poziom akumulacji wzrastał lub malał 2-3 krotnie stanowiły odpowiednio 38% i 26% wszystkich białek różnicujących. Parametry identyfikacji białek wraz z przykładami genotypami, u których obserwowano określoną zmianę w profilu akumulacji umieszczono w materiałach dodatkowych (tab. S1-S2). W tabelach 4.10. i 4.11. podane wartości procentowe dotyczą osobno białek, które uległy wzrostowi w poziomie akumulacji lub spadkowi.

Izoforma B aktywazy RuBisCO (pozycja K2, ryc. 4.1.), białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego (pozycja K4, ryc.4.1.) oraz jego druga izoforma (pozycja K5, ryc. 4.1.) stanowiły białka o najbardziej zmiennym poziomie akumulacji w liniach hodowlanych populacji mapującej. Wzrost profilu akumulacji tych białek w zależności od genotypu wahała się od 2 do 15 razy w stosunku do kontroli (tab. 4.10.). Jednocześnie, te białka różnicowały się w suszy we wszystkich liniach populacji mapującej (izoforma B aktywazy RuBisCO) (ryc. 4.9 A) lub w zdecydowanej większości genotypów (obie izoformy

białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego) (ryc. 4.9 B i C). Dla 15 linii hodowlanych nie można było zidentyfikować plamek reprezentujących izoformy białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego z powodu ich niedostatecznego rozdziału na żelu.

Wykres rozrzutu dla różnicy wartości procenta objętościowego plamki w roślinach poddanych suszy i roślinach kontrolnych (**efekt suszy**) izoformy B aktywazy RuBisCO względem białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego ujawnił wysoki poziom korelacji (współczynnik korelacji, $r=0,66$) pomiędzy genotypami populacji mapującej, co wskazuje na znaczne podobieństwa w reakcji na suszę tych dwóch białek w liniach populacji mapującej (ryc. 4.10 A). Podobny wynik był obserwowany na wykresach rozrzutu dla izoformy B aktywazy RuBisCO i izoformy 2 białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego (ryc. 4.10 B) oraz dla obu izoform białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego (ryc. 4.10 C). Z kolei współczynnik korelacji obserwowany na wykresie rozrzutu dla izoformy B aktywazy RuBisCO względem izoformy A tego białka, które również różnicowało statystycznie wszystkie linie hodowlane rosnące w warunkach kontrolnych od wzrastających w warunkach niedoboru, był niski ($r=0,14$) (ryc. 4.10 D).

Tab. 4.10. Białka, dla których obserwowano wzrost poziomu akumulacji w liniach populacji mapującej MCam.

Zmiana profilu akumulacji (WZROST)	Procent białek	Białka	Funkcja biologiczna
10-15	3%	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza
		Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	
5-10	5%	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza
		Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	
		Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa	
		Białko wiążące światła ER 2	
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	
3-5	24%	Helikaza RNA 9 zależna od ATP	Ekspresja genów
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza
		RuBisCO, mała podjednostka	
		Aktywaza RuBisCO, izoforma A	
		Aktywaza RuBisCO, izoforma B	
		Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	
		Białko wiążące chlorofil	
		Peroksyredoksyna dwucysteinowa	Mechanizmy obronne
		Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	
		Lipooksygenaza 1	
		Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa	
		Białko wiążące światła ER	
		Białko wiążące światła ER 2	

3-5 (c.d.)		Manganianowa dysmutaza nadtlenkowa C-końcowa hydrolaza ubikwityny	Mechanizmy obronne (c.d.)
		Syntaza metioniny Aspartokinaza 2 Reduktoizomeraza ketolokwasowa Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm azotu
		Dehydrogenaza alkoholowa 2 Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla
		Gliksalaza I	Metabolizm wtórny
		Kinaza bogate w powtórzenia cystein	Przekazywanie sygnałów
3-2	67%	Białko rybosomalne 50S z rodziny L2 Syntetaza alanylo-tRNA Polimeraza RNA, podjednostka beta Czynnik transkrypcyjny zależny od etylenu Czynnik inicjacji translacji 4A Acetylotransferaza histonów Deacetylaza histonów 2	Ekspresja genów
		RuBisCO, duża podjednostka RuBisCO, mała podjednostka Aktywaza RuBisCO, izoforma A Aktywaza RuBisCO, izoforma B Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f Białko wiążące chlorofil 2 Oksydoreduktaza NADP ⁺ : ferredoksyna Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon	Fotosynteza
		Peroksyredoksyna dwucysteinowa (fragment) Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne

3-2 (c.d.)	Ligaza ubikwityny E3 Białko F-box SKP2A S-transferaza glutationu Białko szoku cieplnego 70 kDa Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa Białko wiążące światła ER Białko wiążące światła ER 2 Peroksyredoksyna 2E-2, chloroplastowa Proteasom, podjednostka alfa S-transferaza glutationu (homolog) Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa Białko podobne do tioredoksyny	Mechanizmy obronne c.d.
	Syntaza cysteinowa Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego Reduktoizomeraza ketolokwasowa Syntaza metioninowa Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu
	Transferaza adenylowa Kinaza adenylowa Dehydrogenaza alkoholowa Dikinaza glukan, woda Beta-frukofuranozydaza Beta-glukozydaza 43 Anhydraza węglanowa Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksyланu Enolaza Fruktokinaza 1 Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla

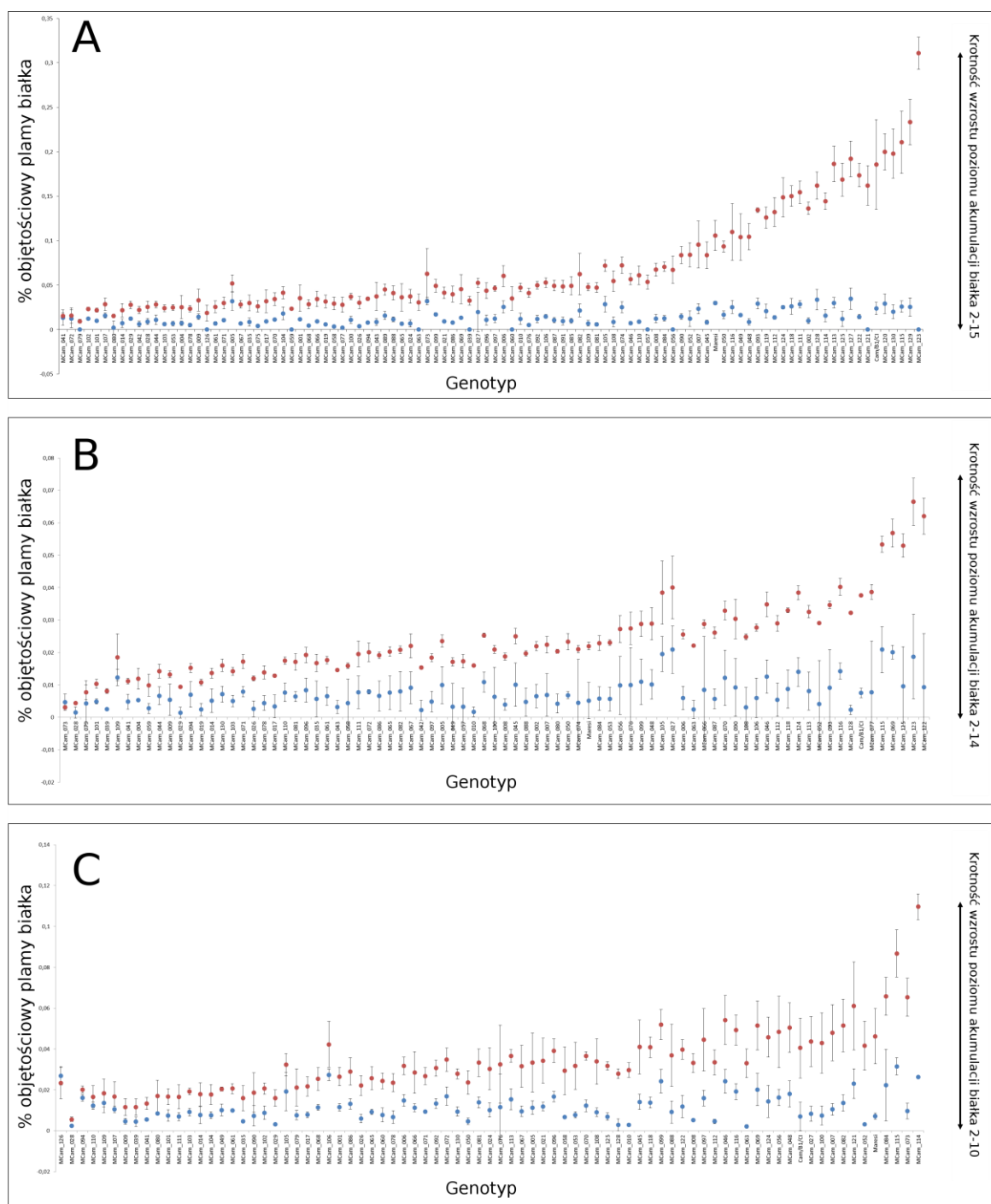
3-2 (c.d.)		Adenylotransferaza glukozy-1-fosforanu Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna) Syntaza skrobi	Metabolizm węgla (c.d.)
		Amoniakoliza fenyloalaniny Monooksygenaza kwasu cynamonowego Glioksalaza I	Metabolizm wtórny
		Białko z rodziny 14-3-3 Kinaza zależna od wapnia Kinaza bogata w powtórzenia cystein Fosfolipaza D Fosfataza 2C (prawdopodobna) Kinaza PERK10	Przekazywanie sygnałów
		Syntaza ATP, podjednostka beta Syntaza ATP, podjednostka gamma Transporter potasu	Transport elektronów/jonów

Tab.4.11. Białka, dla których obserwowano spadek poziomu akumulacji w liniach populacji mapującej MCam.

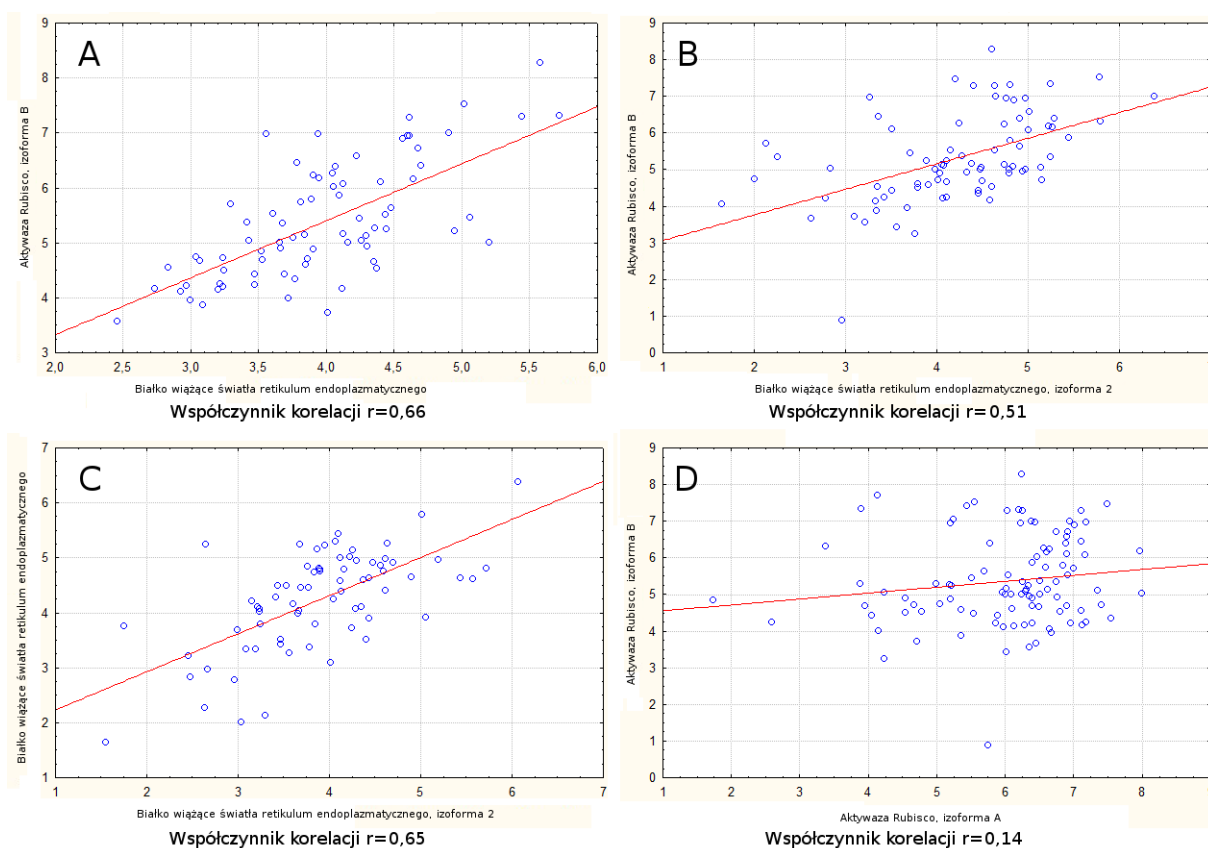
Zmiana profilu akumulacji (SPADEK)	Procent białek	Białka	Funkcja biologiczna
5-10	14%	Syntetaza alanylo- tRNA Czynnik inicjacji transkrypcji TIID, podjednostka 1-A	Ekspresja genów
		RuBisCO, duża podjednostka RuBisCO, mała podjednostka Aktywaza RuBisCO, izoforma A Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon, podjednostka H, Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II	Fotosynteza
		Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne
		Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla
		Białko rybosomalne 50S L2, chloroplastowe	Ekspresja genów
3-5	15%	RuBisCO, duża podjednostka Aktywaza RuBisCO, izoforma A Białko wiążące chlorofil	Fotosynteza
		Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka proteolityczna Peroxidaza askorbinianowa, chloroplastowa	Mechanizmy obronne
		Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla
		Fosfataza 2C (prawdopodobna)	Przekazywanie sygnałów
		Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport elektronów/ionów
		Białko rybosomalne 30S, chloroplastowe	Ekspresja genów

2-3	71%	Białko rybosomalne 40S, chloroplastowe Białko rybosomalne 50S L12, chloroplastowe Polimeraza RNA, podjednostka beta Czynnik elongacyjny Tu, chloroplastowy	
		Białko wiążące chlorofil 2 RuBisCO, duża podjednostka RuBisCO, mała podjednostka Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f Aktywaza RuBisCO, izoforma A Aktywaza RuBisCO, izoforma B Oksydoreduktaza NADP ⁺ :ferredoksyna Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon, podjednostka M, chloroplastowa	Fotosynteza
		Peroksyredoksyna jedno-cysteinowa Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP Białko szoku cieplnego 70 kDa Peroksydaza 46 Peroksydaza 47 Cytochrom P450	Mechanizmy obronne
		Syntaza S-adenozylocysteinowa Syntaza cysteinowa Reduktaza ferredoksyna-azotyn Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu
		Beta-glukozydaza 43	Metabolizm węgla

2-3 (c.d)		Endoglukanaza 16	
		Fruktokinaza 1	
		Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	
		Karboksylaza fosfoenolopirogronianowa	
		Fosforybulokinaza	
		Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	
		Kinaza fosfatydylinozytolu	
		Kinaza PERK10	
		Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport elektronów/jonów
		Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	
		Syntaza ATP, podjednostka gamma, chloroplastowa	



Ryc. 4.9. Profile akumulacji izoformy B aktywazy RuBisCO (A), białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego (B) oraz izoformy 2 białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego w liniach populacji mapującej i odmianach rodzicielskich w warunkach kontrolnych (kolor niebieski) i w warunkach niedoboru wody (kolor czerwony). Obserwowane zmiany poziomu akumulacji tych białek we wszystkich badanych genotypach były istotne statystycznie (p -wartość $\leq 0,05$). Wartości profili białek na wykresach zostały uszeregowane zgodnie ze wzrastającym efektem suszy.



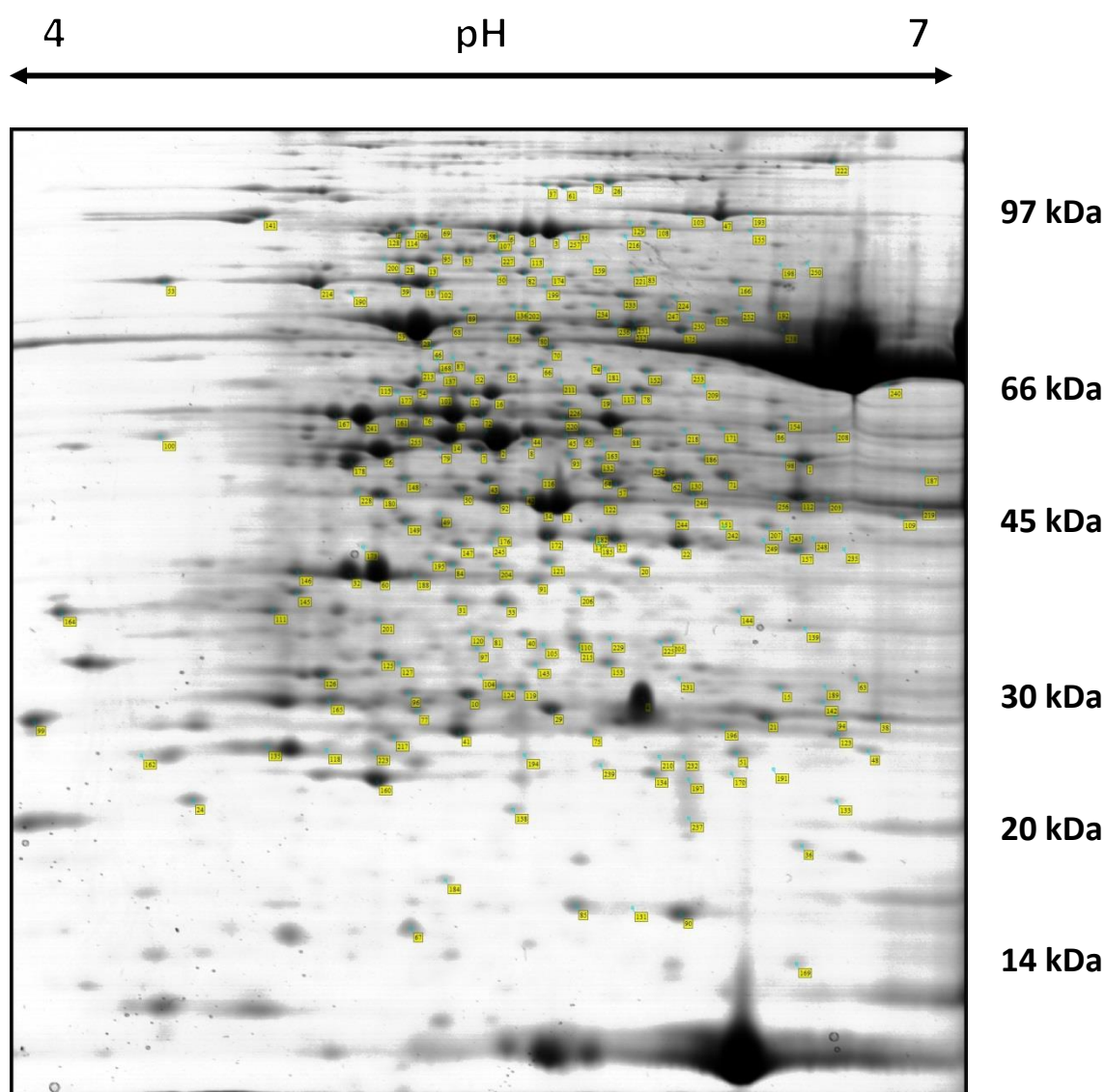
Ryc. 4.10. Wykresy rozrzutu dla efektu suszy: A) izoformy B aktywazy RuBisCO względem białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego, B) izoformy B aktywazy RuBisCO względem izoformy 2 białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego, C) białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego względem jego izoformy, D) izoformy B aktywazy RuBisCO względem izoformy A aktywazy RuBisCO.

Wykorzystana procedura do przeprowadzenia niecelowanej, całościowej analizy zmian proteomu w liniach hodowlanych populacji mapującej M_{Cam} i odmian rodzicielskich pozwoliła na utworzenie 550 zestawów połączeń pomiędzy plamkami reprezentującymi rozdzielone białka.

Poszczególne połączenia plamek pomiędzy żelami były obecne w różnej liczbie linii i zawierały się od 3 do 102. Liczba połączeń białkowych wykryta w poszczególnych genotypach wahała się od 24 do 550. W celu weryfikacji poprawności utworzonych zestawów połączonych plamek białkowych konieczne był ich przejrzenie oraz edycja (usunięcie) części z nich.

Image Master Platinum 2D jest programem pierwszej generacji analizy białek rozdzielonych za pomocą elektroforezy dwukierunkowej, a zaimplementowany w nim algorytm wykrywania i dopasowywania plamek pomiędzy żelami dosyć często popełnia błędy, przez co wymagana jest znaczna interwencja użytkownika, co w przypadku dużej liczby żeli znacznie utrudnia i wydłuża czas analizy (Berth i in., 2007).

Ograniczeniem zastosowanego podejścia całościowej analizy zmian proteomu w 102 genotypach było to, że zestawu niepoprawnie połączonych plamek nie można było korygować (tzn. dzielić lub łączyć plamek) ze względu na konieczność zachowania zgodności w numeracji pomiędzy analizą globalną i analizami pojedynczych genotypów. Z tego powodu jedyną możliwością było ich usunięcie. W rezultacie odrzucono 297 błędnie utworzonych zbiorów plamek, będących efektem błędnego działania algorytmu programu lub/i różnic w umiejscowieniu plamy na żelu spowodowanych przebiegiem rozdziału elektroforetycznego. Odrzucone zestawy plamek były przeważnie obecne tylko na niewielkiej liczbie genotypów ($n \leq 20$). Ponadto duża część z nich powstała w wyniku połączeń pomiędzy zanieczyszczeniami występującymi na żelach, np. smug lub cząsteczek barwnika. Pozostałe 257 zestawów białkowych stanowiło podstawę całościowej analizy zmienności proteomu w suszy w populacji mapującej MCam i odmianach rodzicielskich. Analiza białek metodami spektrometrii mas umożliwiła identyfikację 190 z nich. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, których profile akumulacji zostały wzięte do niecelowanej analizy zmian proteomu został przedstawiony na ryc. 4.11 (rycina w większej rozdzielczości została umieszczona na płycie CD). Nazwy białek zgodne z numeracją z ryc. 4.11 wraz ze średnimi wartościami ich akumulacji w warunkach kontrolnych i niedoboru wody dla populacji mapującej i odmian rodzicielskich zostały przedstawione w tab. 4.12 (tab. 4.12 uzupełniona o parametry identyfikacji jest dostępna w materiałach dodatkowych – tab. S3).



Ryc. 4.11. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, dla których analizowano profile akumulacji w obrębie populacji mapującej i odmianach rodzicielskich. Nazwy białek zostały przedstawione w tab. 4.12.

Tab. 4.12. Białka, dla których monitorowano zmiany w profilach akumulacji w populacji mapującej MCam. Kolor czerwony - białka, dla których średni efekt suszy był istotny statystycznie, kolor niebieski - białka, dla których interakcja genotyp x susza była istotna statystycznie, kolor zielony - białka, dla których średni efekt suszy i interakcja genotyp x susza były istotne statystycznie.

Numeracja na żelu	Liczba genotypów wchodzących w skład profilu	Nazwa białka	Proces biologiczny	Współczynnik korelacji pomiędzy powtórzeniami technicznymi	p-wartość dla różnic pomiędzy liniami	p-wartość dla efektu suszy	p-wartość dla interakcji genotyp x susza	Średnia wartość plamki w kontroli (log2(1000 x % vol))	Średnia wartość plamki w suszy (log2(1000 x % vol))	Efekt suszy
1	102	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.82	0.00E+00	4.21E-18	3.60E-05	5.39	5.29	-0.09
2	102	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.84	0.00E+00	2.78E-21	2.88E-11	7.22	7.38	0.16
3	102	Białko zależne od pirofosforanu tiaminy	Inne	0.79	0.00E+00	1.60E-16	2.82E-02	6.04	5.90	-0.14
4	102	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	0.85	0.00E+00	4.73E-01	7.07E-04	6.80	6.80	-0.01
5	100	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	0.72	0.00E+00	2.06E-01	6.01E-02	5.89	5.91	0.02
6	99	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	0.75	0.00E+00	2.68E-16	8.73E-03	5.17	5.29	0.12
7	98	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.82	0.00E+00	0.00E+00	2.77E-16	5.32	4.80	-0.52
8	97	Aktywaza Rubisco, izoforma B	Fotosynteza	0.93	0.00E+00	0.00E+00	8.83E-21	2.42	3.99	1.56
9	96	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.73	6.31E-34	0.00E+00	6.86E-04	4.09	4.75	0.66
10	96	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	0.82	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.88	4.90	0.01
11	96	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.77	0.00E+00	2.07E-08	9.15E-02	6.96	6.90	-0.06
12	96	Czynnik elongacyjny Tu	Ekspresja genów	0.67	2.78E-31	6.01E-07	3.54E-02	4.67	4.75	0.08
13	96	Metaloпротеaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.69	3.53E-40	3.49E-01	2.33E-06	4.71	4.73	0.02
14	95	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.74	2.92E-31	0.00E+00	1.35E-07	6.36	6.68	0.32
15	95	Peroksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	0.70	0.00E+00	1.23E-34	6.27E-04	2.77	3.10	0.32
16	95	Czynnik elongacyjny Tu, chloroplastowy	Ekspresja genów	0.83	0.00E+00	9.53E-01	1.09E-05	5.71	5.71	0.00
17	95	Kinaza 3-fosfoglicerynianowa	Fotosynteza	0.78	0.00E+00	7.31E-06	1.81E-01	6.55	6.49	-0.06
18	94	Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco, podjednostka beta	Fotosynteza	0.83	0.00E+00	3.03E-03	1.35E-14	5.51	5.46	-0.05
19	94	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	0.84	0.00E+00	0.00E+00	9.77E-12	4.59	4.85	0.26
20	93	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.86	0.00E+00	0.00E+00	5.64E-16	3.70	2.98	-0.72
21	93	Anhidraza węglanowa	Metabolizm węgla	0.89	0.00E+00	4.59E-22	2.01E-10	4.67	4.80	0.14
22	93	Oksydoreduktaza NADP+: ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	0.67	0.00E+00	3.00E-03	6.80E-02	5.42	5.45	0.03
23	93	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.51	2.33E-34	1.47E-03	2.77E-01	7.55	7.50	-0.04
24	92	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	0.69	0.00E+00	4.28E-08	7.06E-07	2.95	3.13	0.17
25	92	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.90	0.00E+00	4.57E-39	1.19E-03	6.21	5.99	-0.22
26	92	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	0.75	0.00E+00	1.96E-06	2.04E-02	3.84	3.93	0.10
27	92	Oksydoreduktaza NADP+:ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	0.92	0.00E+00	0.00E+00	4.71E-03	5.12	4.82	-0.30
28	92	Proteaza zależna od cynku	Mechanizmy obronne	0.58	3.10E-34	7.46E-01	2.65E-02	4.13	4.13	0.01
29	92	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	0.92	0.00E+00	6.01E-02	1.95E-06	4.85	4.82	-0.02
30	92	Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon	Fotosynteza	0.78	0.00E+00	0.00E+00	6.44E-02	4.50	4.76	0.26
31	91	Kinaza adenylanowa	Metabolizm węgla	0.65	0.00E+00	6.51E-40	5.78E-05	3.47	3.75	0.28
32	91	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	0.60	0.00E+00	3.57E-03	3.35E-05	6.08	6.13	0.05
33	91	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.84	0.00E+00	3.49E-01	2.26E-02	4.09	4.10	0.01
34	91	Oksydoreduktaza NADP+:ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	0.73	0.00E+00	6.52E-29	2.30E-01	6.57	6.45	-0.13
35	91	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.38	1.95E-19	3.59E-07	9.91E-02	3.95	3.80	-0.16
36	90	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	0.65	8.11E-21	2.83E-15	1.64E-01	2.39	2.90	0.51
37	90	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	0.63	0.00E+00	7.14E-08	1.89E-02	3.21	3.07	-0.13
38	90	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.77	0.00E+00	8.79E-01	7.22E-08	4.06	4.06	0.00
39	90	Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco, podjednostka beta	Fotosynteza	0.59	1.93E-33	5.64E-08	2.07E-06	4.60	4.70	0.10
40	89	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.70	2.54E-41	0.00E+00	5.14E-10	2.58	3.13	0.55
41	89	Białko wiążące chlorofil	Fotosynteza	0.87	0.00E+00	9.35E-02	2.45E-02	5.08	5.10	0.02
42	89	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.77	0.00E+00	1.89E-11	1.47E-03	3.87	3.75	-0.12
43	89	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.82	0.00E+00	1.05E-01	1.60E-01	4.86	4.83	-0.02
44	89	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.38	1.64E-20	4.66E-01	1.62E-01	4.49	4.51	0.02
45	89	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.58	5.91E-32	7.54E-02	1.41E-01	4.26	4.29	0.03

46	89	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	0.56	1.49E-25	4.88E-01	6.23E-01	4.61	4.59	-0.02
47	88	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.77	0.00E+00	9.77E-26	5.64E-06	5.35	5.54	0.20
48	88	Manganianowa dysmutaza nadtlenkowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	0.58	1.73E-36	9.24E-18	9.23E-03	2.65	2.91	0.27
49	88	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	0.73	0.00E+00	1.29E-34	2.68E-03	4.40	4.20	-0.20
50	88	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.68	0.00E+00	5.12E-11	8.24E-05	3.51	3.64	0.13
51	87	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	0.59	0.00E+00	8.03E-11	6.38E-03	3.45	3.60	0.15
52	87	Pirofosfataza ADP-glukozy	Metabolizm węgla	0.64	1.63E-32	2.09E-15	3.80E-03	2.53	2.74	0.21
53	87	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.32	1.87E-36	6.73E-01	4.95E-05	3.90	3.89	-0.01
54	86	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.85	0.00E+00	6.75E-32	9.75E-09	4.74	5.03	0.29
55	86	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	0.63	0.00E+00	1.73E-03	1.77E-07	3.83	3.87	0.05
56	86	Fosforybulokinaza, chloroplastowa	Fotosynteza	0.62	9.30E-18	1.05E-01	2.31E-04	6.45	6.41	-0.04
57	86	Dehydrogenaza jableczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0.70	0.00E+00	6.59E-01	1.07E-02	5.20	5.21	0.01
58	86	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	0.79	0.00E+00	6.57E-18	8.03E-01	4.43	4.68	0.24
59	86	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.48	1.35E-26	6.33E-01	1.35E-02	6.23	6.24	0.01
60	86	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II	Fotosynteza	0.83	0.00E+00	6.47E-02	1.19E-04	7.01	6.99	-0.02
61	85	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	0.73	4.81E-41	4.14E-29	3.28E-08	3.92	3.67	-0.25
62	85	Epimeraza cukru nukleozydo-difosforanowego	Metabolizm węgla	0.77	0.00E+00	1.16E-20	3.35E-02	5.42	5.29	-0.13
63	85	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.39	3.35E-29	3.34E-03	2.54E-03	3.37	3.31	-0.07
64	85	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.64	4.92E-39	4.59E-01	2.84E-05	4.81	4.80	-0.01
65	85	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.71	0.00E+00	4.72E-32	3.67E-04	4.59	4.86	0.27
66	85	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	0.78	0.00E+00	2.66E-02	8.53E-05	3.59	3.62	0.03
67	85	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.79	4.02E-32	1.33E-03	9.09E-01	3.86	3.97	0.11
68	85	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.48	1.71E-40	7.10E-01	5.76E-04	5.33	5.32	-0.01
69	84	Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego	Mechanizmy obronne	0.89	0.00E+00	0.00E+00	7.21E-18	2.20	3.24	1.04
70	84	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.44	5.02E-19	8.16E-29	7.57E-03	4.10	4.50	0.41
71	84	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.83	0.00E+00	4.10E-07	1.32E-11	5.37	5.27	-0.09
72	84	Aktywa (fragment)	Inne	0.67	1.83E-40	1.13E-06	2.09E-03	4.95	5.03	0.08
73	84	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	0.58	8.83E-34	7.81E-06	1.30E-04	3.37	3.47	0.10
74	84	Peroksydoksyna 2E-2	Mechanizmy obronne	0.42	2.45E-24	2.86E-21	1.03E-06	2.51	2.79	0.28
75	84	Reduktaza dehydroaskorbinienu	Mechanizmy obronne	0.83	0.00E+00	9.34E-01	1.48E-02	3.31	3.31	0.00
76	84	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.67	0.00E+00	1.52E-01	9.49E-08	5.55	5.57	0.02
77	83	Białko szoku cieplnego 20 kDa	Mechanizmy obronne	0.73	1.54E-40	8.36E-25	2.01E-05	4.31	4.15	-0.16
78	83	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	0.83	0.00E+00	5.99E-13	4.24E-09	4.00	4.10	0.11
79	83	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.60	7.97E-35	2.21E-08	4.65E-04	3.81	3.90	0.09
80	82	Enolaza	Metabolizm węgla	0.66	1.10E-36	6.16E-07	7.06E-03	4.94	5.01	0.07
81	81	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.56	6.19E-28	1.38E-13	1.30E-05	2.93	3.13	0.20
82	81	Białko hipotetyczne	Nieznana	0.79	0.00E+00	1.66E-11	2.42E-04	4.08	4.19	0.11
83	81	Wakuolarna pompa protonowa (ATPaza)	Transport jonów/elektronów	0.59	8.87E-35	3.56E-09	5.05E-05	4.02	4.12	0.10
84	80	Gliksalaza I	Metabolizm węgla	0.79	0.00E+00	0.00E+00	5.38E-09	3.63	3.94	0.32
85	80	Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	0.72	0.00E+00	9.74E-01	9.62E-03	3.80	3.80	0.00
86	80	Dehydrogenaza izocytrynianowa	Metabolizm węgla	0.75	0.00E+00	4.05E-01	1.57E-02	4.32	4.33	0.01
87	80	Adenylotransferaza glukozy-1-fosforanu, mała podjednostka	Metabolizm węgla	0.63	2.21E-30	3.55E-19	4.41E-03	3.21	3.50	0.30
88	80	Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego	Metabolizm azotu	0.71	0.00E+00	8.75E-01	1.44E-03	3.65	3.65	0.00
89	80	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.45	8.20E-25	2.43E-01	6.49E-03	3.49	3.54	0.05
90	80	Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	0.54	8.27E-17	1.48E-02	8.05E-02	4.77	4.65	-0.12
91	80	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.69	0.00E+00	1.16E-02	1.56E-10	3.63	3.67	0.04
92	80	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.88	0.00E+00	1.56E-05	8.42E-07	5.54	5.59	0.06
93	79	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.71	2.93E-37	2.50E-22	1.57E-02	3.91	3.70	-0.21
94	79	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	0.54	2.92E-32	5.56E-02	6.22E-03	3.17	3.22	0.05
95	79	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.53	1.95E-25	5.18E-10	1.39E-02	3.40	3.54	0.14
96	79	Białko rybosomalne z rodziny L2	Ekspresja genów	0.59	2.56E-29	7.56E-03	1.44E-03	4.06	4.11	0.05
97	78	Amoniakoliza fenyloalaninowa	Metabolizm węgla	0.50	9.74E-35	1.37E-30	2.95E-08	2.63	2.92	0.30
98	78	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.47	2.54E-33	7.05E-04	1.81E-02	3.31	3.38	0.07
99	78	Czynnik transkrypcyjny z rodziny NAC	Ekspresja genów	0.78	2.53E-27	1.51E-03	8.28E-01	4.50	4.35	-0.15
100	78	Transporter magnezu MRS2-5	Transport jonów/elektronów	0.54	3.23E-30	1.25E-05	5.40E-01	3.20	3.06	-0.14
101	78	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.41	2.21E-18	4.82E-08	2.36E-05	3.66	3.80	0.15
102	77	Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco, podjednostka beta	Fotosynteza	0.50	1.06E-24	8.07E-01	2.60E-05	3.53	3.53	0.01
103	77	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.75	0.00E+00	2.72E-27	6.09E-03	4.54	4.85	0.31
104	77	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.58	2.19E-33	9.20E-16	1.47E-01	2.91	2.69	-0.22

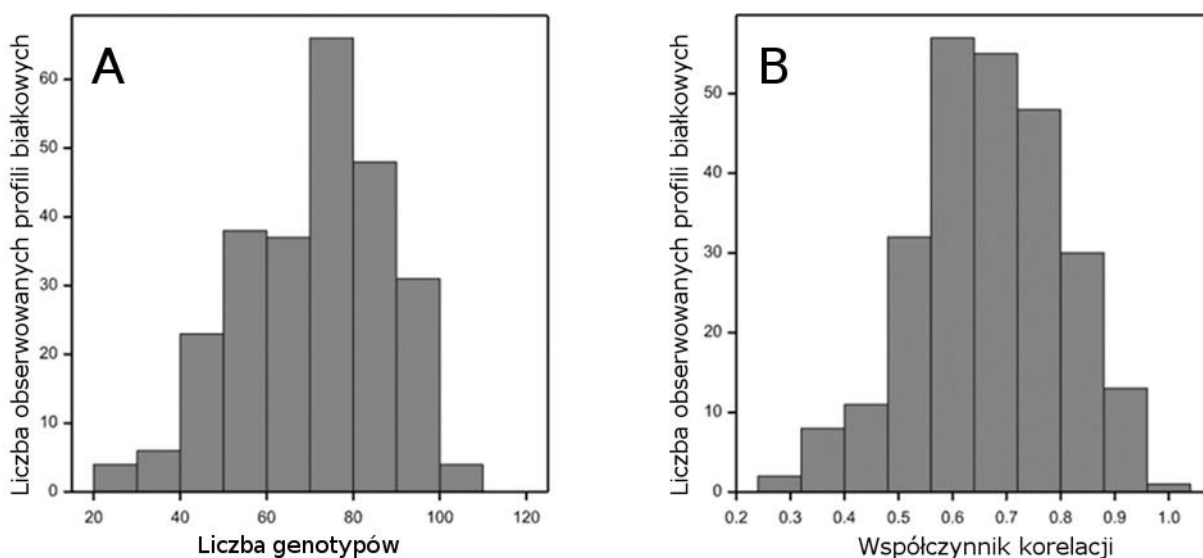
105	77	Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.49	1.14E-23	1.04E-22	4.45E-05	2.88	3.21	0.34
106	76	Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego 2	Mechanizmy obronne	0.85	0.00E+00	0.00E+00	2.81E-20	2.57	3.53	0.97
107	76	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.69	2.57E-28	2.45E-25	5.15E-02	3.16	3.39	0.23
108	76	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.69	2.38E-37	4.95E-02	5.47E-03	3.31	3.35	0.04
109	76	Dehydrogenaza jablczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0.45	2.06E-29	1.47E-02	5.02E-02	4.42	4.48	0.05
110	76	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.63	3.73E-32	2.03E-02	4.64E-08	3.81	3.79	-0.03
111	76	Homolog białka z rodziny 14-3-3	Mechanizmy obronne	0.64	6.26E-25	5.30E-04	1.05E-02	3.35	3.43	0.08
112	76	Syntaza ATP, podjednostka gamma, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	0.90	0.00E+00	1.31E-15	7.38E-15	5.32	5.11	-0.21
113	76	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.84	0.00E+00	2.45E-02	1.30E-02	3.60	3.64	0.04
114	75	Mediator podjednostki transkrypcyjnej polimerazy II RNA (prawdopodobny)	Mechanizmy obronne	0.71	7.64E-39	3.30E-36	3.55E-02	4.05	3.65	-0.40
115	75	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.70	9.81E-31	1.47E-36	4.20E-10	4.04	4.43	0.39
116	75	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.61	7.69E-31	7.62E-04	1.67E-03	3.98	4.07	0.10
117	75	Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	0.57	1.04E-28	2.27E-05	1.12E-03	3.29	3.21	-0.08
118	75	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	0.57	0.00E+00	1.28E-01	4.82E-08	4.64	4.69	0.05
119	75	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.70	0.00E+00	1.38E-01	2.15E-02	3.40	3.42	0.03
120	75	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.56	5.69E-27	2.10E-05	1.54E-02	3.27	3.37	0.10
121	75	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.65	4.76E-30	4.85E-33	1.67E-05	3.62	3.35	-0.26
122	75	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.77	0.00E+00	4.42E-18	2.65E-04	3.46	3.65	0.19
123	74	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	0.68	0.00E+00	4.25E-36	1.77E-14	3.26	3.56	0.30
124	74	Nieorganiczna pirofosfataza	Inne	0.73	0.00E+00	8.33E-29	8.70E-06	3.36	3.63	0.28
125	74	Peroooksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	0.60	2.37E-21	1.77E-12	8.89E-01	4.15	4.33	0.17
126	74	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	0.65	3.80E-23	3.25E-01	9.46E-01	5.09	5.07	-0.03
127	74	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.44	5.75E-33	2.63E-12	6.42E-02	3.54	3.37	-0.17
128	74	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.60	3.26E-24	2.67E-11	1.69E-04	4.65	4.48	-0.16
129	74	Kinaza z nieaktywnym receptorem	Przekazywanie sygnałów	0.50	2.62E-12	9.24E-01	1.60E-01	3.27	3.28	0.00
130	73	Cykлина H1	Regulacja cyklu komórkowego	0.84	0.00E+00	0.00E+00	2.12E-12	3.74	4.25	0.51
131	73	Translokaza secA, chloroplastowa	Transport białek	0.68	3.03E-39	1.57E-08	5.19E-03	3.22	2.99	-0.23
132	73	Niezidentyfikowane	Inne	0.64	2.13E-28	3.10E-17	1.77E-01	3.88	3.73	-0.15
133	73	Tubulina, łańcuch beta-2	Białko strukturalne	0.54	4.07E-17	1.48E-01	2.73E-02	2.23	2.16	-0.06
134	73	Białko rybosomalne z rodziny L10	Ekspresja genów	0.83	0.00E+00	2.29E-07	2.75E-02	3.54	3.44	-0.09
135	73	Peroksydoksyna dwu-cysteinowa (fragment)	Mechanizmy obronne	0.61	0.00E+00	5.03E-07	1.78E-02	4.86	4.98	0.12
136	73	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.69	1.29E-30	5.68E-02	3.43E-06	2.95	2.91	-0.04
137	73	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.59	1.77E-30	6.02E-08	3.65E-03	3.01	3.12	0.11
138	72	Lipokalina indukowana temperaturą	Mechanizmy obronne	0.68	9.62E-28	4.95E-29	3.03E-07	2.71	3.22	0.51
139	72	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	0.29	5.35E-07	8.47E-01	1.41E-01	2.96	2.95	-0.01
140	72	Białko błony wewnętrznej chloroplastu HSP70	Transport jonów/elektronów	0.51	2.14E-17	8.21E-05	5.58E-01	5.31	5.23	-0.08
141	71	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.57	2.96E-26	3.89E-15	7.03E-04	4.78	4.56	-0.22
142	71	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.71	3.49E-36	3.19E-18	4.55E-02	3.02	3.23	0.21
143	71	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.72	0.00E+00	2.29E-23	5.40E-06	3.33	3.12	-0.21
144	71	Nieorganiczna pirofosfataza	Inne	0.48	1.71E-18	6.59E-01	2.66E-01	3.25	3.23	-0.01
145	71	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.77	0.00E+00	4.79E-04	2.31E-15	3.93	3.99	0.06
146	71	Apocytochrom f	Fotosynteza	0.55	3.78E-26	4.96E-09	1.07E-01	4.37	4.57	0.20
147	71	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.80	0.00E+00	6.83E-37	6.09E-03	3.55	3.85	0.30
148	71	Białko zaangażowane w biogenezę fotosystemu II	Fotosynteza	0.61	1.84E-06	1.53E-01	3.23E-01	4.39	4.44	0.05
149	71	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	0.70	1.88E-30	2.67E-12	3.54E-01	3.94	4.08	0.14
150	70	Reduktaza ferredoksyna-azotyn	Metabolizm azotu	0.62	1.54E-24	3.29E-32	1.38E-02	4.20	3.90	-0.30
151	70	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.72	0.00E+00	3.22E-03	2.08E-05	3.49	3.45	-0.04
152	70	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa	Metabolizm węgla	0.70	1.93E-40	8.06E-12	3.87E-03	3.72	3.81	0.09
153	69	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.69	0.00E+00	5.18E-01	1.21E-04	3.57	3.59	0.01
154	69	Aminotransferaza	Metabolizm azotu	0.67	0.00E+00	9.94E-15	2.03E-05	3.53	3.41	-0.11
155	69	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.61	1.08E-31	1.55E-02	4.22E-03	2.82	2.89	0.07
156	69	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.53	5.65E-21	5.03E-17	3.88E-01	3.65	3.87	0.23
157	68	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	0.95	0.00E+00	1.51E-38	1.80E-05	4.42	3.88	-0.55
158	68	Translacyjnie kontrolowane białko nowotworu (homolog)	Mechanizmy obronne	0.72	0.00E+00	7.49E-09	9.51E-04	3.03	3.21	0.18
159	68	Syntetaza alanilo-RNA	Ekspresja genów	0.63	8.92E-24	1.95E-02	2.93E-05	2.53	2.48	-0.06
160	68	Tiodoksyna	Mechanizmy obronne	0.83	0.00E+00	1.64E-01	2.27E-01	5.36	5.33	-0.03
161	68	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	0.62	2.82E-27	1.98E-01	1.01E-04	5.04	5.08	0.04
162	67	Peroksydoksyna dwu-cysteinowa	Mechanizmy obronne	0.57	1.46E-29	5.63E-05	6.82E-03	3.73	3.88	0.15
163	67	Białko odporności na choroby At5g45440 (prawdopodobne)	Mechanizmy obronne	0.54	5.42E-17	2.81E-13	1.80E-01	3.46	3.64	0.18

164	65	Białko zawierające domenę wiążącą RNA	Ekspresja genów	0.66	5.19E-36	7.07E-17	8.14E-02	3.86	3.53	-0.32
165	65	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	0.61	9.13E-33	1.88E-01	4.27E-03	3.95	3.91	-0.04
166	65	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.58	1.63E-26	2.88E-04	7.45E-05	2.72	2.81	0.09
167	65	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	0.64	3.10E-23	6.95E-03	3.07E-03	5.93	5.87	-0.06
168	65	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.75	9.55E-20	4.79E-01	3.66E-01	3.09	3.12	0.03
169	64	Peroksyreduktyna dwu-cysteinaowa	Mechanizmy obronne	0.92	4.90E-41	6.78E-10	3.00E-07	3.04	3.35	0.31
170	64	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.61	1.86E-24	7.07E-17	3.89E-03	3.06	2.66	-0.40
171	64	Rubisco, mała podjednostka (fragment)	Fotosynteza	0.65	3.95E-24	1.03E-11	9.41E-07	3.33	3.15	-0.18
172	64	Oksydoreduktaza NADP+ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	0.98	0.00E+00	7.35E-02	4.08E-12	4.69	4.66	-0.02
173	64	Białko związane z patogenezą	Mechanizmy obronne	0.67	1.58E-22	1.07E-01	5.60E-01	2.82	2.77	-0.05
174	64	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.69	1.78E-23	4.78E-01	1.50E-01	2.41	2.39	-0.02
175	64	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	0.81	5.81E-37	3.67E-07	9.56E-01	4.40	4.53	0.13
176	64	Oksydoreduktaza NADP+ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	0.76	0.00E+00	6.87E-14	2.26E-02	4.03	4.17	0.14
177	63	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.62	5.32E-20	0.00E+00	2.35E-04	3.15	2.87	-0.28
178	63	Fosforybulokinaza, chloroplastowa	Fotosynteza	0.56	2.50E-24	1.72E-03	1.62E-03	6.18	6.08	-0.10
179	63	Białko związane z wysychaniem PCC27-45	Mechanizmy obronne	0.87	0.00E+00	7.07E-16	1.51E-02	4.03	4.22	0.19
180	62	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.89	1.62E-35	3.53E-17	1.13E-19	3.81	4.31	0.50
181	62	Tubulina, łańcuch beta-2	Białko strukturalne	0.76	1.72E-31	1.78E-02	7.43E-03	2.60	2.66	0.06
182	62	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.87	0.00E+00	2.10E-10	1.18E-04	3.66	3.78	0.12
183	62	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.35	5.61E-12	4.66E-04	3.28E-02	2.47	2.53	0.06
184	61	Rubisco, duża podjednostka (fragment)	Fotosynteza	0.64	3.93E-21	2.83E-16	7.14E-05	2.69	2.28	-0.41
185	61	Rubisco, mała podjednostka (fragment)	Fotosynteza	0.62	5.53E-22	3.54E-02	1.31E-01	2.43	2.36	-0.07
186	61	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.90	0.00E+00	3.28E-04	1.67E-03	3.68	3.63	-0.06
187	60	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.51	7.73E-24	1.96E-13	4.76E-02	3.43	3.75	0.32
188	60	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	0.35	2.54E-14	2.19E-01	8.64E-02	4.43	4.48	0.05
189	60	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.61	1.45E-21	3.09E-01	1.00E-01	2.56	2.59	0.03
190	59	Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco, podjednostka alfa	Fotosynteza	0.82	7.98E-28	9.42E-02	1.38E-04	3.33	3.26	-0.07
191	59	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	0.56	1.64E-17	3.48E-05	3.76E-06	2.81	2.62	-0.20
192	59	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.73	2.13E-40	3.23E-05	3.97E-02	4.40	4.50	0.10
193	59	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.66	1.37E-32	2.75E-05	1.09E-02	3.44	3.56	0.12
194	58	Lipokalina indukowana temperaturą	Mechanizmy obronne	0.64	4.77E-23	1.84E-07	3.92E-02	3.32	3.17	-0.16
195	58	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	0.72	1.04E-33	2.05E-12	8.15E-08	3.60	3.49	-0.11
196	58	Anhidraza węglanowa	Metabolizm węgla	0.62	5.54E-31	8.44E-02	3.66E-02	3.86	3.82	-0.04
197	58	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.69	6.82E-21	3.75E-05	4.23E-01	3.81	3.64	-0.16
198	58	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.55	2.78E-13	4.66E-04	4.21E-02	2.66	2.79	0.13
199	58	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.54	1.09E-17	1.31E-05	2.81E-01	2.76	2.89	0.13
200	58	Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.52	1.97E-12	1.79E-04	9.46E-02	3.32	3.44	0.12
201	57	C-końcowa hydrolaza ubikwityny	Mechanizmy obronne	0.48	8.08E-20	7.07E-17	7.18E-03	3.88	3.67	-0.21
202	57	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.76	3.79E-31	3.02E-09	3.13E-06	3.42	3.59	0.18
203	57	Syntaza ATP, podjednostka gamma, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	0.60	6.16E-22	1.98E-01	4.78E-02	3.65	3.68	0.03
204	57	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.71	3.11E-27	2.32E-02	1.96E-05	3.06	3.11	0.06
205	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.66	3.19E-28	4.33E-05	4.07E-03	3.31	3.38	0.07
206	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.52	2.84E-17	1.13E-03	7.67E-01	2.72	2.84	0.12
207	56	Białko rybosomalne z rodziny L2	Ekspresja genów	0.67	1.68E-30	1.53E-02	6.32E-05	3.68	3.64	-0.05
208	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.54	3.12E-13	4.04E-02	4.50E-02	3.24	3.31	0.07
209	56	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.62	3.28E-20	3.45E-03	5.04E-02	3.12	3.20	0.07
210	55	Białko rybosomalne 50S	Ekspresja genów	0.76	3.09E-27	7.25E-01	1.24E-02	2.90	2.89	-0.01
211	55	Syntaza S-adenozylometioninowa 3	Metabolizm azotu	0.77	1.77E-29	3.15E-05	3.35E-02	3.56	3.66	0.10
212	55	Peroksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	0.67	7.71E-20	1.63E-08	6.57E-02	4.67	4.87	0.20
213	55	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.86	2.18E-35	2.32E-13	1.96E-01	3.06	3.21	0.15
214	54	Białko wiążące dużą podjednostkę Rubisco, podjednostka alfa	Fotosynteza	0.75	2.32E-14	4.35E-03	6.47E-01	5.23	5.14	-0.09
215	54	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.59	7.94E-21	7.46E-02	1.18E-01	3.18	3.21	0.03
216	54	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.62	2.90E-28	1.05E-01	3.03E-03	2.19	2.22	0.03
217	54	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.79	8.02E-31	2.55E-15	8.66E-04	4.15	3.94	-0.21
218	54	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.50	1.50E-07	1.18E-02	2.30E-01	2.66	2.73	0.08
219	53	Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0.55	7.78E-13	2.82E-01	1.66E-03	4.30	4.36	0.06
220	53	Aktywaza Rubisco, izoforma B	Fotosynteza	0.89	0.00E+00	1.72E-07	9.15E-05	4.61	4.50	-0.11
221	53	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.44	7.06E-16	2.13E-03	3.87E-02	2.60	2.66	0.06
222	53	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.56	3.47E-17	4.38E-03	3.69E-01	4.72	4.85	0.12

223	53	Niezidentyfikowane	Mechanizmy obronne	0.56	1.74E-21	6.82E-05	3.92E-01	4.19	4.30	0.11
224	52	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.56	0.00E+00	0.00E+00	8.81E-07	3.05	3.29	0.24
225	50	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.72	0.00E+00	2.14E-08	2.08E-01	2.68	2.85	0.17
226	50	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego B, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.70	3.53E-17	0.00E+00	9.99E-04	4.04	3.84	-0.20
227	50	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.72	0.00E+00	4.69E-08	9.41E-02	3.06	3.19	0.13
228	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.75	0.00E+00	0.00E+00	3.10E-04	3.13	3.77	0.63
229	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.64	8.20E-15	7.71E-03	7.35E-01	2.87	2.98	0.11
230	48	Reduktaza glutationowa	Mechanizmy obronne	0.66	0.00E+00	2.13E-01	2.28E-04	3.00	2.97	-0.04
231	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.48	1.59E-15	1.17E-01	9.16E-01	2.52	2.56	0.05
232	48	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.62	0.00E+00	5.03E-03	1.09E-03	3.20	3.29	0.09
233	47	Aktywaza Rubisco, izoforma B	Fotosynteza	0.87	2.69E-32	0.00E+00	7.76E-12	3.22	3.71	0.49
234	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.53	1.33E-09	3.43E-07	1.49E-01	2.66	2.52	-0.14
235	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.37	2.75E-13	6.08E-02	1.74E-01	2.43	2.49	0.06
236	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.62	2.06E-21	9.24E-01	5.76E-02	3.52	3.52	0.00
237	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.79	2.00E-15	2.70E-02	5.53E-01	2.75	2.70	-0.05
238	47	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.60	1.08E-19	8.55E-02	1.98E-01	4.54	4.59	0.05
239	46	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	0.57	4.88E-15	4.61E-05	3.66E-01	2.75	2.61	-0.14
240	45	Rubisco, duża podjednostka	Fotosynteza	0.77	1.22E-32	2.44E-15	1.59E-05	5.80	5.33	-0.47
241	45	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	0.26	3.46E-07	3.03E-03	1.91E-01	6.70	6.62	-0.08
242	44	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.53	2.48E-13	3.46E-03	1.56E-03	3.39	3.44	0.04
243	44	Białko zawierające domenę W40	Multiple	0.74	0.00E+00	2.32E-07	2.92E-03	3.56	3.44	-0.12
244	44	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.79	3.91E-37	3.72E-04	3.60E-02	3.75	3.79	0.04
245	43	Białko z motywem "F-box"	Przekazywanie sygnałów	0.77	1.34E-25	4.81E-02	1.17E-04	3.07	3.11	0.04
246	42	Rubisco, mała podjednostka	Fotosynteza	0.81	2.33E-15	0.00E+00	1.54E-12	3.48	3.71	0.23
247	42	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.56	0.00E+00	0.00E+00	3.60E-03	3.52	3.74	0.22
248	40	Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	0.89	1.77E-17	3.53E-17	3.70E-07	3.94	3.44	-0.50
249	40	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.48	1.14E-13	4.25E-03	6.05E-07	2.80	2.71	-0.09
250	39	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.59	3.09E-21	4.08E-09	1.62E-02	2.94	3.07	0.13
251	38	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.80	4.63E-29	3.41E-02	1.29E-03	4.08	4.12	0.04
252	35	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.60	1.72E-07	1.08E-10	3.56E-01	3.03	3.35	0.31
253	32	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.56	1.91E-13	1.73E-08	1.06E-02	2.62	2.77	0.15
254	29	Aktywaza Rubisco, izoforma A	Fotosynteza	0.71	2.69E-13	1.78E-15	4.52E-02	4.12	3.90	-0.22
255	29	Sedoheptulozo-1,7-bisfosfatasa	Fotosynteza	0.65	7.21E-09	7.56E-15	1.21E-01	5.32	5.73	0.40
256	27	Epimeraza cukru nukleozydo-difosforanowego	Metabolizm węgla	0.38	1.73E-05	5.97E-05	5.24E-01	3.37	3.51	0.14
257	21	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.65	2.06E-09	2.35E-04	4.02E-02	2.79	2.71	-0.08

Wyodrębnione surowe dane obserwowanych profili białkowych zostały obliczone jako wartości procenta objętościowego plamki i transformowane poprzez ich pomnożenie przez 1000 oraz zlogarytmowanie ($\log_2(1000 \times \% \text{ vol})$) w celu przybliżenia ich rozkładu do rozkładu normalnego. Trzy profile białkowe stanowiły sumę większej ilości zestawów połączeń: nr 112 (zestawy nr 119, 125, 498), nr 154 (162, 283), 244 (104, 528).

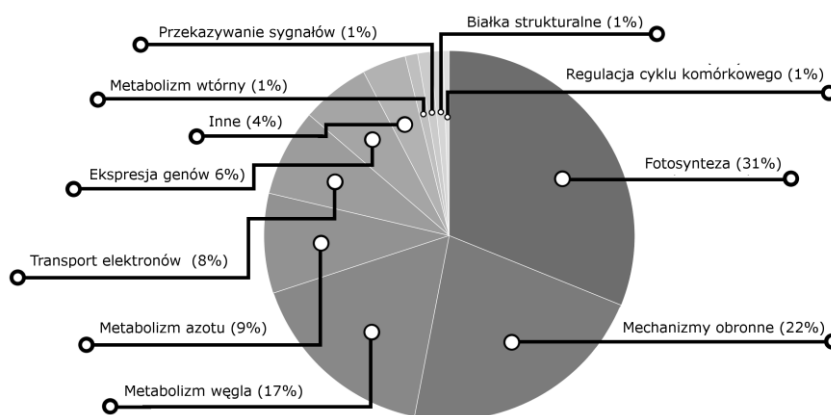
Wyselekcjonowane zbiory plamek białkowych były obserwowane w 21-102 genotypach (ryc. 4.12 A) i większość z nich charakteryzowała się wysokim ($0,5 \leq r \leq 0,7$) i bardzo wysokim współczynnikiem korelacji ($0,7 \leq r \leq 0,9$) pomiędzy powtórzeniami technicznymi rozdzielów elektroforetycznych (wg Skali Stanisza) (ryc. 4.12 B).



Ryc. 4.12. Charakterystyka obserwowanych profili białkowych w odniesieniu do liczby genotypów, w których obserwowano profile białkowe (A) oraz współczynnika korelacji dla profili białkowych pomiędzy powtórzeniami technicznymi rozdzielów elektroforetycznych (B).

Białka wybrane do niecelowanej analizy zmian profili akumulacji zostały pogrupowane ze względu na pełnione przez nie funkcje. Najliczniej reprezentowane były kategorie, w których wyróżniono białka związane z fotosyntezą (57 białek), mechanizmami obronnymi (40 białek) oraz metabolizmem węgla (31 białek). Do kategorii związanej z metabolizmem azotu zaliczono 16 białek, transportem jonów i elektronów – 14 białek, ekspresją genów -11 białek. W kategoriach związanych z metabolizmem wtórnym,

przekazywaniem sygnałów wyróżniono po 2 białka. Pozostałe zidentyfikowane białka pełniły funkcje strukturalne oraz były związane regulacją cyklu komórkowego (ryc. 4.13).



Ryc. 4.13. Klasyfikacja białek wybranych do analizy profili akumulacji w populacji mapującej MCam liści badanych genotypów.

Analiza wariancji (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego) wykazała, że dla wszystkich białek istniały statystycznie istotne różnice w poziomie akumulacji w obrębie wszystkich badanych linii i genotypów rodzicielskich.

Efekt suszy, czyli różnica pomiędzy wartością poziomu akumulacji w suszy i wartością w kontroli dla danego białka, był istotny statystycznie dla 147 białek (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego). Interakcje pomiędzy liniami populacji mapującej MCam i suszą były istotne statystycznie dla 84 białek (p-wartość $<0,05$ z poprawką Bonferroniego). 55 białek było istotnych statystycznie zarówno dla efektu suszy i efektu interakcji (tab. 4.13). Białka, dla których efekt suszy, interakcja genotyp $\times$ susza oraz oba te przedziały były istotne statystycznie zostały wyróżnione kolorami w tabeli 4.12.

Tab. 4.13. Klasyfikacja białek w odniesieniu do istotności zmian poziomu akumulacji białek w suszy w porównaniu do kontroli (efekt suszy) oraz oddziaływań pomiędzy liniami i suszą (interakcja genotyp $\times$ susza).

Efekt suszy	Interakcja genotyp $\times$ susza		
	Nieistotny	Istotny	Suma
Nieistotny	81	29	110
Istotny	92	55	147
Suma	173	84	257

Pośród 147 białek, dla których średni efekt suszy dla genotypów populacji mapującej był istotny statystycznie, 54 uległo spadkowi, natomiast pozostałe 93 białka charakteryzowały się wzrostem poziomu akumulacji (tab.4.14.). Najwyższy dodatni efekt suszy był obserwowany dla izoformy B aktywazy RuBisCO (plamka nr 8, tab. 4.12.), dwóch izoform białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego (plamki nr 69 i 106, tab. 4.12.) oraz białka szoku cieplnego 70kDa (plamka nr 9, tab.4.12). Natomiast najwyższym ujemnym efektem suszy charakteryzowały się dwie izoformy aktywazy RuBisCO A (plamki nr 7 i 20, tab. 4.12.) oraz dwie izoformy oksydoreduktazy NADP⁺: ferredoksyna (plamki nr 157 i 248, tab.4.12.).

W grupie 84 białek, dla których interakcja genotyp $\times$ susza była istotna statystycznie wzrost akumulacji spowodowanej suszą był obserwowany u 51 białek (tab.4.15.). Najsilniejszą korelację genotyp $\times$ susza wykazywały te same białka, u których obserwowano najwyższy dodatni efekt suszy: izoforma B aktywazy RuBisCO (plamka nr 8, tab.4.12.), białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego (plamka nr 69, tab.4.12.) oraz izoforma 2 tego białka (plamka nr 106, tab.4.12.).

W celu sprawdzenia istotności odchyień w proporcji pomiędzy ujemnym, nieistotnym i dodatnim efektem suszy dla kategorii funkcjonalnych 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. Kolorem szarym zaznaczono efekty, które istotnie odbiegały od średnich zmian w suszy dla sumy obserwacji wszystkich białek: „+” - większa liczba zmian dla danej kategorii niż spodziewana, „-” - mniejsza liczba zmian dla danej kategorii niż spodziewana (tab.4.14.).

Tab. 4.14. Klasyfikacja białek w kategoriach funkcjonalnych w odniesieniu do średniej zmiany poziomu akumulacji w suszy w porównaniu do kontroli w liniach populacji mapującej.

Funkcja biologiczna	Efekt suszy			
	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma
Metabolizm węgla	7	11	13	31
Regulacja cyklu komórkowego	0	0	1	1
Mechanizmy obronne	8	8 (-)	24 (+)	40
Ekspresja genów	2	8 (+)	1 (-)	11
Transport elektronów	3	6	5	14
Metabolizm azotu	4	5	7	16
Inne	4	1	2	7
Fotosynteza	17 (+)	25	15 (-)	57
Metabolizm wtórny	0	0	2	2
Przekazywanie sygnałów	0	2	0	2
Białka strukturalne	0	2	0	2
Niezidentyfikowane	9 (-)	42	23	74
Suma obserwacji	54	110	93	257

Proporcja pomiędzy ujemnym (spadek akumulacji), nieistotnym i dodatnim (wzrost akumulacji) efektem suszy dla sumy obserwacji wynosiła odpowiednio 54:110:93 (efekt suszy ujemny (U) : nieistotny (N) : dodatni (D) 1:2:1,7).

Największym odchyleniem od proporcji średnich zmian w suszy wszystkich białek (suma obserwacji) charakteryzowała się kategoria związana z mechanizmami obronnymi (U:N:D 1:1:3). W tej grupie obserwowano zwiększoną liczbę białek, których profil akumulacji w suszy uległ wzrostowi, w porównaniu do rozkładu proporcji dla sumy obserwacji (p -wartość<0.001).

W kategorii ekspresja genów (U:N:D 2:8:1) odnotowano mniejszą niż oczekiwana proporcja liczbę białek o dodatnim efekcie suszy (p -wartość=0,027).

Wśród białek związanych fotosyntezą (U:N:D 1,1:1,7:1) obserwowano odchylenia w obu kierunkach od proporcji efektów suszy dla wszystkich białek. W tej kategorii odnotowano więcej białek o ujemnym efekcie suszy (p -wartość=0,024) oraz znaczne mniejszą liczbę białek o dodatnim efekcie suszy (p -wartość=0,038) niż spodziewane proporcje dla sumy obserwacji.

Test zgodności χ^2 został przeprowadzony również w celu sprawdzenia odchylenia proporcji istotnej i nieistotnej interakcji genotyp x susza w kategoriach funkcjonalnych zawierających więcej niż 5 białek od proporcji istotności statystycznej interakcji genotyp x susza dla wszystkich białek (suma obserwacji) (tab. 4.15).

Tab.4.15. Klasyfikacja białek w kategoriach funkcjonalnych w odniesieniu do interakcji pomiędzy badanymi genotypami populacji mapującej i suszą.

Funkcja biologiczna	Interakcja genotyp x susza			
	Nieistotna	Istotna		Suma
		Efekt suszy		
		Dodatni	Ujemny	
Metabolizm węgla	25	5	1	31
Regulacja cyklu komórkowego	0	1	0	1
Mechanizmy obronne	27	10	3	40
Ekspresja genów	6	2	3	11
Transport elektronów	11	1	2	14
Metabolizm azotu	11	4	1	16
Inne	6	1	0	7
Fotosynteza	30	11	16	57
Metabolizm wtórny	0	2	0	2
Przekazywanie sygnałów	1	1	0	2
Białka strukturalne	2	1	0	2
Niezidentyfikowane	54	12	8	74
Suma obserwacji	173	84		257

Proporcja interakcji genotyp x susza nieistotnych do istotnych statystycznie dla wszystkich obserwowanych białek wynosiła w przybliżeniu 2:1. Na podstawie testu zgodności χ^2 dla kategorii, w których zawierało się więcej niż 5 białek (p-wartość=0,094) stwierdzono, że proporcje interakcji genotyp x susza istotnych statystycznie do nieistotnych w poszczególnych kategoriach nie odbiegają od proporcji dla sumy obserwacji.

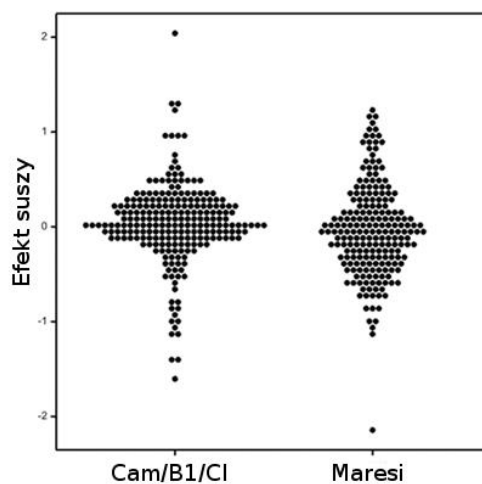
Analiza porównawcza profili akumulacji białek genotypów rodzicielskich dla 257 wybranych białek wykazała, że poziom akumulacji większości białek w suszy był wyższy

w Cam/B1/CI niż w Maresi, natomiast w warunkach kontrolnych większa liczba białek charakteryzowała się wyższym profilem akumulacji w odmianie niemieckiej (tab. 4.16).

Tab. 4.16. Porównanie poziomu akumulacji białek w kontroli i suszy w odmianach rodzicielskich.

Poziom akumulacji białek	Kontrola	Susza
Wyższy w Maresi	50	34
Równy	108	109
Wyższy w CAM/B1/CI	40	78
Całkowita liczba białek	198	221

Efekt suszy dla obserwowanych białek dla obu genotypów różnił się zwłaszcza w liczbie białek o niezmienionym profilu akumulacji oraz białek o obniżonym profilu akumulacji w suszy (ryc. 4.14). Wartości profili akumulacji białek dla tych odmian są dostępne w materiałach dodatkowych (tab. S4).



Ryc. 4.14. Rozkład efektu suszy dla obserwowanych profili białkowych w genotypach rodzicielskich.

W genotypie Cam/B1/CI więcej białek (56%) nie uległo istotnej zmianie w suszy w porównaniu do Maresi (36%). Większa ilość białek wykazywała ujemny efekt suszy

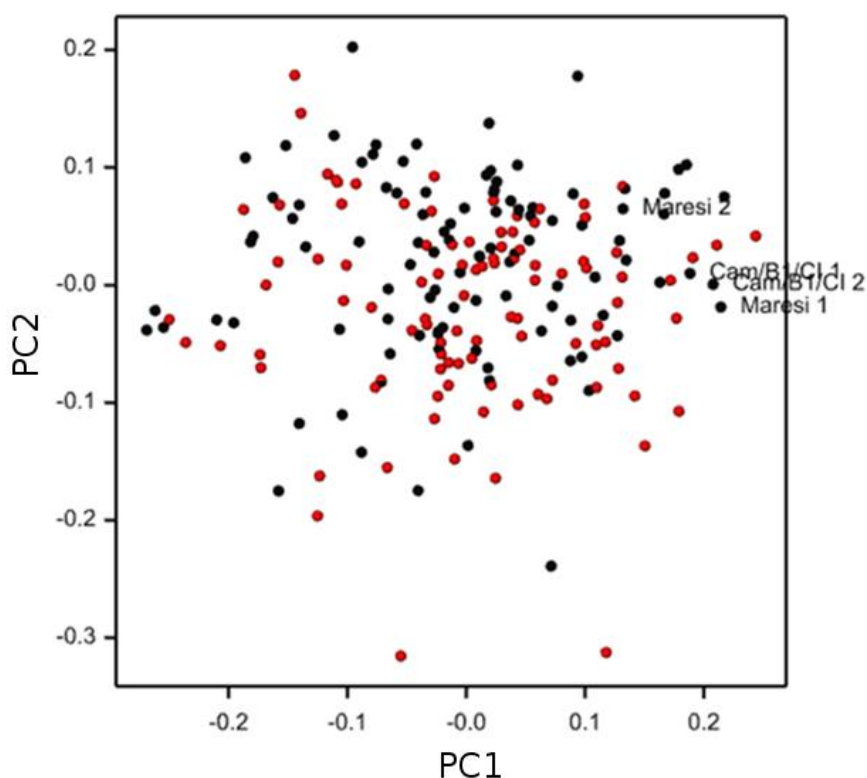
w Maresi (35%) w porównaniu do Cam/B1/CI (14%), co było szczególnie widoczne w kategoriach mechanizmy obronne i fotosynteza (tab. 4.17.).

Obserwowane proporcje zmian akumulacji białek odzwierciedlają wyniki uzyskane dla tych odmian we wcześniejszej analizie, w której identyfikowano białka różnicujące rośliny kontrolne od wzrastających w warunkach niedoboru wody. Rekcja proteomu Cam/B1/CI w porównaniu do Maresi była o wiele mniejsza i w przeciwieństwie do odmiany niemieckiej większość białek charakteryzowała się zwiększonym poziomem akumulacji (ryc. 4.3.).

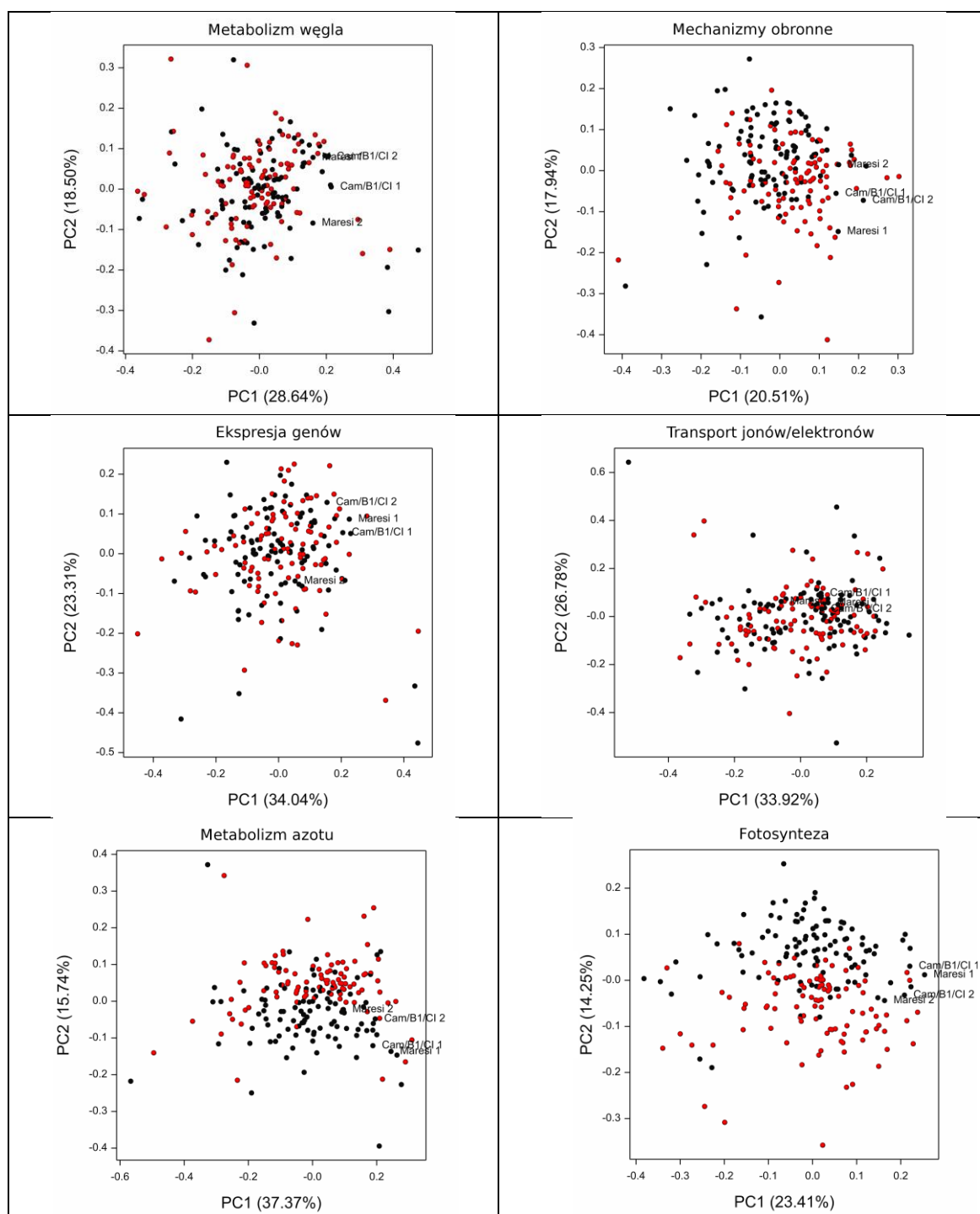
Tab. 4.17. Klasyfikacja białek w kategoriach funkcjonalnych w odniesieniu do średniej zmiany poziomu akumulacji w suszy w porównaniu do kontroli dla odmian rodzicielskich. Kolorem szarym zaznaczono kategorie, w których występowały istotne różnice w poziomie akumulacji białek pomiędzy dwoma genotypami.

Funkcja biologiczna	Efekt suszy							
	Cam/B1/CI				Maresi			
	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma	Ujemny	Nieistotny	Dodatni	Suma
Metabolizm węgla	3	16	7	26	10	12	3	25
Regulacja cyklu komórkowego	0	0	1	1	0	0	1	1
Mechanizmy obronne	4	16	11	31	13	9	10	32
Ekspresja genów	2	6	2	10	4	3	2	9
Transport elektronów	2	6	5	13	2	7	3	12
Metabolizm azotu	3	8	2	13	7	5	1	13
Inne	0	6	1	7	4	0	3	7
Fotosynteza	10	25	14	49	23	15	12	50
Metabolizm wtórny	0	1	1	2	0	0	2	2
Przekazywanie sygnałów	0	1	0	1	0	0	0	0
Białka strukturalne	0	2	0	2	0	0	1	1
Niezidentyfikowane	7	35	18	60	10	30	13	53
Suma obserwacji	31	122	62	215	73	81	51	205

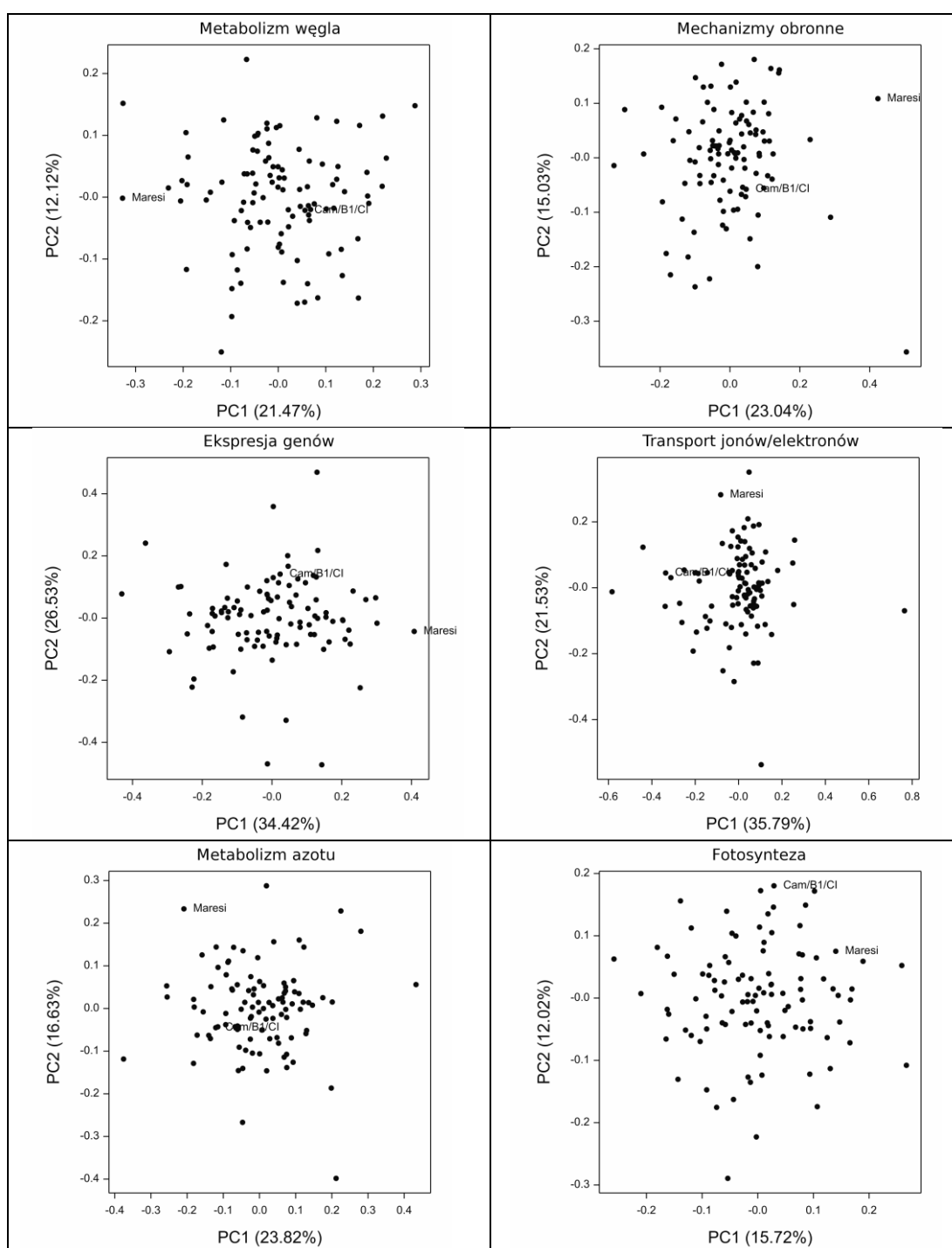
Analiza współrzędnych głównych (PCO, ang. *principal coordinates analysis*) została wykonana dla genotypów rodzicielskich i linii rekombinacyjnych populacji mapującej dla wszystkich analizowanych białek w kontroli i suszy (ryc. 4.15.), a także dla kategorii, w których występowało więcej niż 10 białek (ryc. 4.16.) oraz dla efektu suszy w każdej z tych kategorii (ryc. 4.17.).



Ryc. 4.15. Analiza składowych głównych. Linie hodowlane populacji MCam i odmiany rodzicielskie zostały przedstawione w płaszczyźnie dwóch pierwszych współrzędnych głównych obliczonych dla poziomu akumulacji białek w warunkach kontrolnych i niedoboru wody. Kolor czarny – genotypy w warunkach kontrolnych, kolor czerwony – genotypy w warunkach suszy. 1- odmiany rodzicielskie w warunkach kontroli, 2-odmiany rodzicielskie w warunkach suszy.



Ryc. 4.16. Analiza składowych głównych dla wyodrębnionych kategorii funkcjonalnych białek. Linie hodowlane populacji M-Cam i odmiany rodzicielskie zostały przedstawione w płaszczyźnie dwóch pierwszych współrzędnych głównych obliczonych dla poziomu akumulacji białek w warunkach kontrolnych i niedoboru wody. Kolor czarny – genotypy w warunkach kontrolnych, kolor czerwony – genotypy w warunkach suszy. 1- odmiany rodzicielskie w warunkach kontroli, 2-odmiany rodzicielskie w warunkach suszy.



Ryc. 4. 17. Analiza współrzędnych głównych efektu suszy. Linie hodowlane populacji Maresi i odmiany rodzicielskie zostały przedstawione w płaszczyźnie dwóch pierwszych współrzędnych głównych obliczonych dla poziomu akumulacji białek w warunkach kontrolnych i niedoboru wody.

Na podstawie analizy współrzędnych głównych dla wszystkich białek nie widać istotnego zróżnicowania się linii hodowlanych i form rodzicielskich (ryc.4.15.). Z kolei wykresach PCO dla profili akumulacji białek w kategoriach mechanizmy obronne, fotosynteza i metabolizm azotu genotypy w kontroli i suszy różnią się przede wszystkim pod względem drugiej współrzędnej głównej (ryc. 4.16.).

W kategorii fotosynteza o różnicach pod względem drugiej współrzędnej głównej decydują białka natomiast dwie izoformy A aktywazy RuBisCO (plamki nr 7 i 20, tab.4.12.) oraz oksydoreduktaza NADP^+ : ferredoksyna (plamka nr 157, tab.4.12.), które były mocno skorelowane dodatnio (wyższy poziom akumulacji w suszy) z drugą współrzędną. O różnicach pomiędzy genotypami pod względem drugiej współrzędnej decydują także izoforma B aktywazy RuBisCO (plamka nr 8, tab.4.12.), sedoheptulozo-1,7-bisfosfataza (plamka nr 255, tab. 4.12.) oraz trzy inne izoformy A aktywazy RuBisCO (plamka nr 14, 115 i 213, tab.4 12.), które stanowiły białka najsilniej skorelowane ujemnie (wyższy profil akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy) z drugą współrzędną.

W kategorii, w której wyróżniono białka uczestniczące w mechanizmach obronnych największe zróżnicowanie genotypów w kontroli i suszy obserwowano dla dwóch izoform białka szoku cieplnego 70 kDa (plamka nr 9 i 107, tab.4.12.) oraz dwóch izoform białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego (plamki nr 69 i 106, tab. 4.12.), które były ujemnie skorelowane z drugą współrzędną główną.

W kategorii metabolizm azotu szczególnie silnie ujemnie skorelowanym białkiem z drugą współrzędną główną była syntaza cysteinowa, której średni efekt suszy w populacji mapującej był dodatni (plamka nr 49, tab.4.12.). Dwie izoformy syntazy metioninowej (plamka nr 47 i 103, tab.4 12.) oraz syntetaza glutaminowa (plamka nr 167, tab. 4.12.) wykazywały korelację dodatnią z drugą współrzędną.

Dla pozostałych kategorii funkcjonalnych nie obserwowano zróżnicowania badanych genotypów rosnących w warunkach kontrolnych i suszy (ryc. 4.16.).

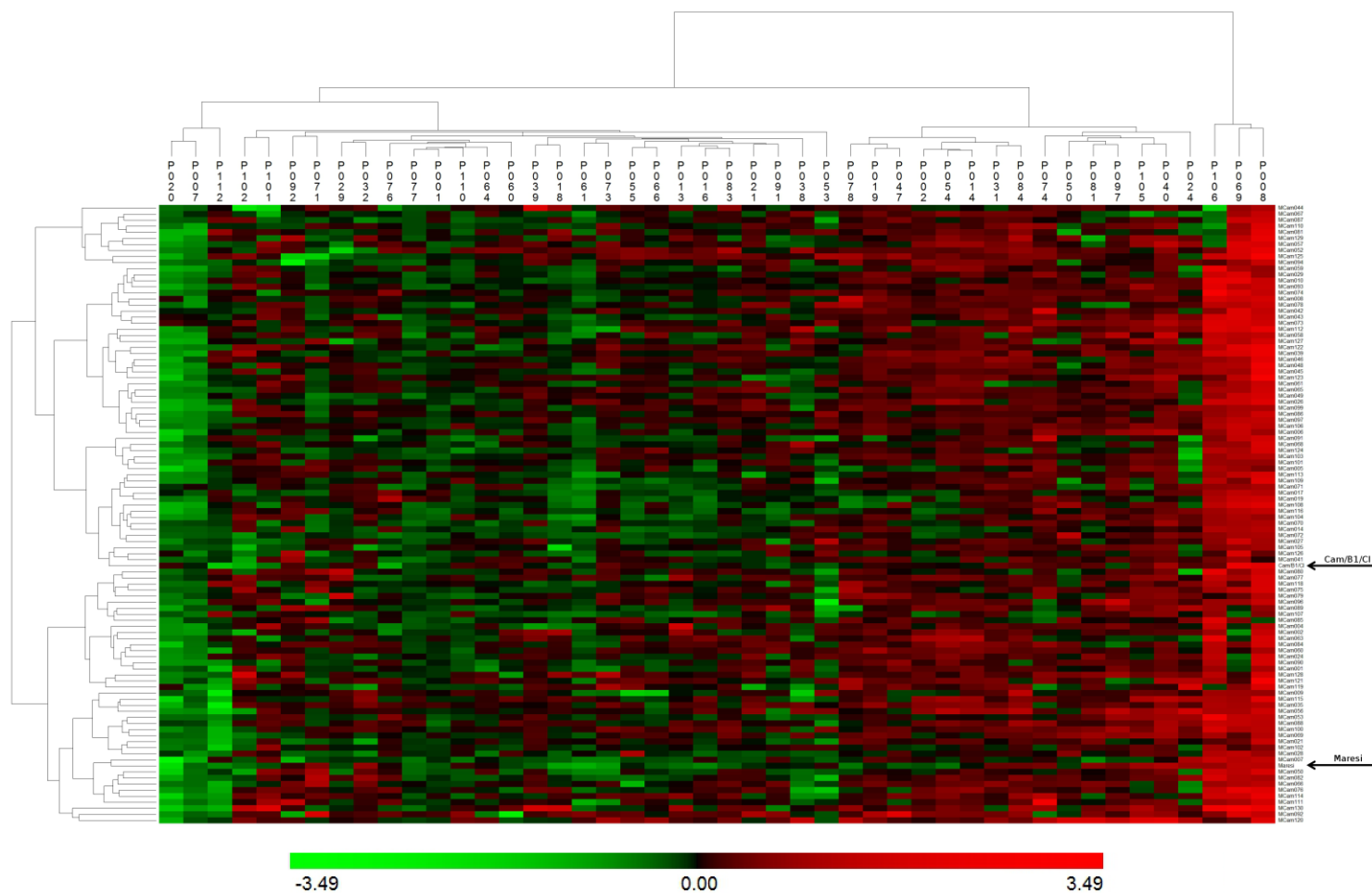
Analiza PCA dla efektu suszy (ryc. 4.17.) ujawniała, że istnieje znaczące zróżnicowanie Maresi od Cam/B1/CI i większości rekombinacyjnych linii wsobnych we wszystkich kategoriach oprócz fotosyntezy, gdzie odległość pomiędzy genotypami rodzicielskimi jest niewielka. W kategoriach fotosynteza oraz metabolizm węgla istnieje duża zmienność względem obu współrzędnych głównych dla badanych genotypów. W kategorii mechanizmy obronne i transport elektronów wykresy PCO wskazują, że analizowane genotypy są bardziej zróżnicowane względem drugiej głównej współrzędnej.

Dwukierunkowe grupowanie hierarchiczne (HCA, ang. *hierarchical cluster analysis*) wykonano metodą Warda na podstawie odległości euklidesowej. Wyniki tej analizy zostały zobrazowane w postaci map cieplnych i dendrogramów dla efektu suszy 46 wyselekcjonowanych białek z grupy 84, dla których istotna statystycznie była interakcja genotyp $\times$ susza (ryc. 4.18.). Dendrogramy wraz z mapą cieplną w dużej rozdzielczości są dostępne w materiałach dodatkowych na dołączonej płycie CD.

Analiza skupień wykazała, że różnice pomiędzy genotypami dotyczą przede wszystkim poziomu zmian akumulacji danego białka, a nie kierunku tej zmiany, co wskazuje na silnie konserwatywną odpowiedź proteomu na suszę badanych genotypów jęczmienia.

Najbardziej wyróżniającą się grupą białek, które charakteryzowały się dużym dodatnim efektem suszy były: aktywaza RuBisCO B (P008, ryc. 4.18.; plamka nr 8, tab. 4.12.), białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego (P069, ryc. 4.18.; plamka nr 69, tab. 4.12.) oraz druga izoforma tego białka, (P106, ryc. 4.18.; plamka nr 106, tab. 4.12.).

Z kolei wśród białek o dużym i głównie ujemnym efekcie suszy najbardziej wyróżniały się dwie izoformy A aktywazy RuBisCO (P007 i P020, ryc. 4.18; plamka nr 7 i 20, tab. 4.12.) oraz podjednostka gamma mitochondrialnej syntazy ATP (P112, ryc. 4.18.; plamka nr 112, tab. 4.12.). Na dendrogramie segregującym badane genotypy widać wyraźne zróżnicowanie na dwie grupy. Zróżnicowanie to dotyczyło również form rodzicielskich (ryc. 4.18.).



Ryc. 4.18. Mapa cieplna i dendrogram dla efektu suszy 46 białek, które posiadały istotną statystycznie interakcję genotyp x susza. W kolumnach znajdują się białka, natomiast w wierszach genotypy populacji mapującej MCam i genotypy rodzicielskie. Kolor czerwony – wzrost akumulacji białek w suszy, kolor zielony – spadek akumulacji. Strzałkami wyróżniono odmiany rodzicielskie. Numeracja białek jest zgodna z tab.4.12.

5. DYSKUSJA

Jednym z zagrożeń XXI wieku dla bezpieczeństwa światowej gospodarki jest susza. Problem ten dotyczy większości obszarów Europy, w tym także Polski. Według danych klimatycznych, Wielkopolska jest regionem szczególnie narażonym na wystąpienie suszy, zwłaszcza latem (brak opadów) oraz jesienią (niski stan wód, spadek wilgotności). Spadki plonów spowodowane deficytem wody mogą sięgać nawet 40%, co przekłada się na znaczne straty finansowe rolników i prowadzi do wzrostu cen żywności.

Aby zaspokoić potrzeby żywieniowe rosnącej liczby ludności nowe odmiany roślin uprawnych będą musiały znaczenie efektywniej wykorzystywać dostępną im wodę i jednocześnie charakteryzować się wysokim plonem. Klasyczne metody otrzymywania nowych odmian roślin stosowane przez hodowców oparte na obserwacjach wizualno-morfologicznych mogą okazać się niewystarczające do optymalnego wytwarzania krzyżówek dostosowanych do panujących warunków środowiska.

W celu przyspieszenia postępu biologicznego w rolnictwie konieczne jest rozwijanie nowych strategii krzyżowania roślin uprawnych opartych na wykorzystaniu nowoczesnych metod biotechnologicznych np. hodowli wspomaganej markerami genetycznymi (MAB, ang. *marker-assisted breeding*). Analiza populacji mapujących utworzonych z genotypów rodzicielskich posiadających odmienne cechy pozwala na ustalenie markerów genetycznych związanych z konkretnymi cechami ilościowymi (QTL) np. plonem i elementami związanymi z jego strukturą jak wysokość rośliny, liczba rozkrzewień, długość kłosa czy liczba ziaren w kłosie. Uzupełnienie map genetycznych danymi pochodzącymi z innych poziomów molekularnych, np. metabolomu i proteomu, może znacznie poszerzyć wiedzę na temat odpowiedzi roślin na dany stres i przyczynić się do zidentyfikowania większej liczby markerów związanych z odpornością na niekorzystny czynnik. Efekty pracy naukowej mogą następnie zostać wykorzystane przez hodowców, dzięki czemu będą oni w stanie otrzymać nowe odmiany roślin o ulepszonych cechach użytkowych, które lepiej będą sobie radzić w niekorzystnych warunkach środowiska.

Przedmiotem badań w niniejszej pracy jest analiza proteomiczna wpływu deficytu wody na zmiany w poziomie akumulacji białek w liściach 100 linii populacji mapującej jęczmienia jarego, ich form rodzicielskich: Maresi, Cam/B1/CI oraz dwóch odmian referencyjnych: Sebastian, Stratus. Do analizy zmian w proteomach roślin wykorzystano

dwukierunkową elektroforezę w żelu poliakrylamidowym jako technikę rozdzielania białek i spektrometrię mas MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF, stosowane podczas identyfikacji białek. Wykorzystanie możliwości przeprowadzania kolizyjnie indukowanej fragmentacji wybranych peptydów w aparacie MALDI-TOF/TOF pozwoliło na zidentyfikowanie większej liczby białek niż w przypadku stosowania techniki peptydowego odcisku palca (ryc. 3.3.). Wynika to, między innymi z faktu, że nie są jeszcze dostępne kompletne sekwencje genowe jęczmienia (Porubleva i Chitnis, 2000).

Warunki suszy, w których prowadzono doświadczenia umożliwiły obserwację zmian zachodzących w proteomie w każdym z analizowanych genotypów (ryc. 4.1., tab. 4.10., 4.11., 4.12.), a otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na fakt, że niedobór wody ma ogromny wpływ na profil akumulacji białek w roślinie. Zidentyfikowane białka, których poziom akumulacji zmienił się pod wpływem suszy były zaangażowane w różnorodne procesy biochemiczne związane z mechanizmami obronnymi, fotosyntezą, metabolizmem węgla i azotu, ekspresją genów, transportem jonów i elektronów oraz metabolizmem wtórnym (ryc. 4.6., 4.8., 4.13.).

W badaniach dotyczących wpływu stresów abiotycznych na rośliny identyfikowana jest coraz większa liczba genów, transkryptów i białek, które biorą udział w odpowiedzi na niekorzystny czynnik środowiskowy, jednakże ich dokładana rola jaką mogłyby pełnić w związku z odpornością na stres pozostaje bardzo często bez odpowiedzi. Większość ze zidentyfikowanych podczas tych analiz białek należy traktować jako wskaźniki zmian metabolizmu pierwotnego i zachodzących procesów degeneracyjnych spowodowanych wystąpieniem suszy, które nie mają bezpośredniego związku z podwyższoną tolerancją na ten stres. Aczkolwiek, całościowa analiza zmian zachodzących w proteomie pod wpływem niekorzystnego czynnika środowiskowego dostarcza wielu informacji na temat przebiegu procesów związanych z odpowiedzią roślin na stres. Może także pełnić pomocniczą rolę w selekcji odmian odpornych.

W analizie 4 genotypów: Cam/B1/CI, Maresi, Sebastian i Stratus, poziom akumulacji większości białek, które zareagowały na niedobór wody był różny pomiędzy odmianami (ryc. 4.1; tab. 4.1.-4.4.), co szczególnie widać w zestawieniu białek, których zmiana względnej ilości w stosunku do kontroli była istotna w przynajmniej dwóch genotypach (tab. 4.7.). W większości przypadków dla konkretnego białka obserwowano jednolity kierunek zmiany w odmianach, w których wystąpiła, ale o mniejszej lub większej wartości, co pomimo różnic w pochodzeniu odmian świadczy o dosyć konserwatywnej odpowiedzi na niedobór wody, ale czy każda różnica w poziomie akumulacji ma wpływ na odporność danej odmiany na stres?

Poszukiwanie markerów białkowych związanych z odpornością na suszę i inne stresy abiotyczne jest zadaniem trudnym m.in. ze względu na dużą zmienność proteomu. Ponadto liczba obiektów w takich badaniach rzadko przekracza 2-4 genotypy, co m.in. wynika z praco i czasochłonności stosowanej metodyki. Biorąc pod uwagę dużą zmienność proteomu, wynikiem takiej analizy jest zazwyczaj identyfikacja dużej liczby białek, których poziom akumulacji różni się pomiędzy kontrastującymi genotypami. Jednakże, ze względu na małą liczbę obiektów wziętych do badań, nie ma możliwości statystycznej oceny zachodzących interakcji dla poszczególnych białek. Fakt ten znacznie utrudnia selekcję białek mogących mieć bezpośredni wpływ na przystosowanie się danej odmiany do warunków niedoboru wody i odróżnieniu ich od białek, których zmiana profilu akumulacji jest związana wyłącznie z zaistnieniem niekorzystnego czynnika środowiskowego.

Analiza dużej ilości genotypów, np. populacji mapującej, może w znacznym stopniu ułatwić poszukiwanie białek-markerów, związanych z odpornością na stres, a wykorzystanie odpowiednich technik statystycznej oceny uzyskanych danych pozwala na odróżnienie potencjalnych kandydatów związanych z tolerancją stresu od tła, czyli białek, których zmiana profilu akumulacji stanowi przede wszystkim wskaźnik zaistnienia niekorzystnych warunków środowiskowych i dla których interakcja susza $\times$ genotyp nie jest istotna. Potencjalne białka-markery, których poziom akumulacji w suszy jest statystycznie różny pomiędzy badanymi genotypami, muszą następnie zostać skorelowane ze zmierzonymi cechami ilościowymi, m.in. dotyczącymi plonu i wzrostu roślin, a także danymi z innych poziomów molekularnych, w celu zidentyfikowania cechy, z którą zmiana poziomu akumulacji konkretnego białka mogłaby być związana. Pomimo tego, że obiektem badań proteomicznych są często rośliny uprawne to rzadkością są prace, w których bierze się pod uwagę plon jako jedną z determinantów stabilnego wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiska.

Z drugiej jednak strony, analiza porównawcza dużej ilości genotypów stanowi ogromne wyzwanie zarówno pod względem organizacyjnym, analitycznym jak i obliczeniowym. O ile analizowanie pojedynczych genotypów i identyfikacja różnic w profilu akumulacji pomiędzy suszą i kontrolą nie powoduje większych trudności w programie Image Master Platinum 2D to porównanie profili akumulacji białek dużej liczby badanych genotypów nie tylko między kontrolą i suszą, a także w celu znalezienia istotnych różnic pomiędzy badanymi genotypami wymagało zastosowania odmiennego podejścia i wykorzystania dodatkowego oprogramowania (ryc. 3.2.) oraz metod analizy statystycznej niedostępnych w programie Image Master Platinum 2D.

Zarówno w analizie 4 odmian (rodzicielskich i referencyjnych), 100 linii rekombinacyjnych populacji mapującej M_{Cam}, jak i analizie, w której oceniano całościowy profil zmian akumulacji białek w genotypach populacji mapującej i rodzicielskich, w grupie trzech najliczniej reprezentowanych kategorii znajdowały się białka biorące udział w mechanizmach obronnych, fotosyntezie i metabolizmie węgla (ryc. 4.6., 4.8., 4.13.).

Niedobór wody powoduje znaczne zmiany w fotosyntezie i zwykle prowadzi do obniżenia wydajności tego procesu (Lawlor i Cornic, 2002). Białka związane z fotosyntezą stanowiły jedną z najliczniej reprezentowanych kategorii białek, których poziom akumulacji uległ zmianie się pod wpływem suszy (ryc. 4.6., 4.8., 4.13., tab. 4.10., 4.11., 4.14.), a także których profil akumulacji wyraźnie różnicował badane genotypy w suszy i kontroli (ryc. 4.16).

W roślinach wyższych szybkość fotosyntezy zależy od aktywności RuBisCO (Reddy i in., 2004). Obniżenie aktywności RuBisCO, centralnego enzymu aparatu fotosyntetycznego, jest główną, nie związaną z zamykaniem aparatów szparkowych, przyczyną ograniczenia fotosyntezy w suszy (Bota i in., 2004; Lawlor i Cornic, 2002). W zależności od intensywności stresu, efekt ten może być bardzo zróżnicowany: od jego braku po bardzo silny (Budak i in., 2013). Różnice w poziomie akumulacji dużej podjednostki tego białka w analizie odmian rodzicielskich i referencyjnych mogły być spowodowane aktywnością systemów usuwania wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu, które są generowane w suszy powodują m.in. degradację tej podjednostki, co jest uważane za główny powód spadku syntezy tego enzymu w warunkach niedoboru wody (Hajheidari i in., 2005; Luo i in., 2002). RuBisCO, jako część fotosystemu I, może być zaangażowane również w adaptację roślin do warunków niedoboru wody poprzez rozpraszanie nadmiaru docierającej energii w cyklicznym przepływie elektronów (Xu i in., 2009). Pomimo tego, że zmiana poziomu akumulacji dużej podjednostki RuBisCO różnicowała odmiany rodzicielskie, to w przypadku linii populacji mapującej poddanej działaniu suszy w przeważającej większości, za wyjątkiem sześciu genotypów, obserwowano spadek względnej ilości tego białka. Dla dużej podjednostki RuBisCO nie odnotowano istotnych statystycznie interakcji pomiędzy badanymi genotypami i suszą, podobnie jak w przypadku małej podjednostki, która również wykazywała ujemny efekt suszy (spadek poziomu akumulacji) w liniach hodowlanych populacji mapującej. Prawdopodobnie tego rodzaju zmiany wskazują na ogólny mechanizm odpowiedzi na niedobór wody. W pracach, w których badano wpływ niedoboru wody na siewki jęczmienia, spadek poziomu akumulacji dużej podjednostki RuBisCO odnotowano zarówno w odmianach odpornych jak i wrażliwych na suszę, chociaż, dla tych drugich, spadki względnej ilości były większe

i dotyczyły kilku izoform (Ashoub i in., 2013; Ford i in., 2011). Z kolei w innych badaniach obserwowano wzrost względnej ilości tej podjednostki (Budak i in., 2013). Niejednoznaczność wyników mogła być spowodowana różnicami m.in. w intensywności zastosowanych warunków stresu, wyboru roślin oraz etapu ich rozwoju czy identyfikacją różnych izoform białka.

Połączenie się małej i dużej podjednostki RuBisCO w funkcjonalne białko jest procesem wymagającym energii i obecności innego białka, a mianowicie białka wiążącego dużą podjednostkę RuBisCO (cpn60). Aktywność tego enzymu bezpośrednio wpływa na ilość RuBisCO w komórce. Spadki poziomu akumulacji kilku izoform różnych podjednostek tego białka we wszystkich badanych genotypach potwierdzają negatywny wpływ suszy na fotosyntezę i pozostają w zgodzie z obserwowanymi zmianami dla dużej i małej podjednostki RuBisCO (Demirevska i in., 2008). Podobne wyniki opisano w badaniach wpływu niedoboru wody na lucernę. Obniżenie profilu akumulacji RuBisCO oraz białka cpn60 powiązano z koniecznością mobilizacji azotu, którego spadek został spowodowany inhibicją aktywności nitrogenaz. Enzym RuBisCO, który w komórkach stanowi ok. 50% wszystkich białek cytoplazmatycznych, jest olbrzymim rezerwuarem azotu, a jego degradacja może kompensować braki tego pierwiastka w roślinie (Aranjuelo i in., 2011).

Najczęściej identyfikowanym białkiem różnicującym rośliny kontrolne od wzrastających w warunkach suszy były różne izoformy aktywazy RuBisCO (tab. 4.10., 4.11.). W całościowej analizie profili białkowych ten enzym był reprezentowany przez 15 izoform A i 3 B (tab. 4.12.). U wielu roślin aktywaza RuBisCO występuje w postaci dwóch izoform o masach 42 i 46 kDa. Izoforma A posiada dodatkową sekwencję 30 aminokwasów na końcu karboksylowym białka. Obie izoformy są produktem alternatywnego *splicingu* mRNA jednego genu, ale np. w bawelnie są one kodowane przez dwa różne geny (Salvucci i in., 2003). W jęczmieniu oba warianty aktywazy również powstają w wyniku alternatywnego składania genu *rcaA*, ale dodatkowo u tego gatunku izoforma B jest kodowana przez drugi gen *rcaB* (Rundle i Zielinski, 1991). Białko to bierze udział w regulacji aktywności RuBisCO poprzez usuwanie ufosforylowanych cukrów z miejsca katalitycznego, np. gromadzonego w ciemności 2-karboksyarabinitolu (Demirevska i in., 2008).

Przeprowadzenie reakcji karboksylacji przez RuBisCO wymaga przejścia enzymu w stan aktywny i odpowiedniej sekwencji wiązania substratów reakcji. Najpierw następuje przyłączenie CO₂ do miejsca katalitycznego enzymu i w drugiej kolejności kofaktora, którym jest jon Mg²⁺. Tak aktywowany enzym po przyłączeniu rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP) jest w stanie przeprowadzić proces karboksylacji. Jeżeli natomiast, RuBP przyłączy się do

nieaktywnego enzymu reakcja nie zachodzi, a efektywność wiązania CO₂ spada. W trakcie suszy, w warunkach ograniczonej dostępności CO₂ i obniżonej aktywności fotosyntetycznej, nadmiar rybulozo-1,5-bisfosforanu będzie wiązał się z większą wydajnością do miejsca katalitycznego nieaktywnego enzymu (Parry i in., 2002).

Rozbieżność w profilach akumulacji różnych izoform A aktywazy RuBisCO może świadczyć o ich innej roli w adaptacji rośliny do suszy oraz różnicach w regulacji ich aktywności, chociaż dla większości izoform A obserwowano obniżenie profilu akumulacji, co z kolei może sugerować mniejsze zaangażowanie izoformy A w aktywację RuBisCO podczas długotrwałej suszy. W rzodkiewniku pospolitym oraz szpinaku (*Spinacia oleracea* L.) wykazano, że izoformy aktywazy RuBisCO o masach 43 i 46 kDa posiadają różne systemy regulacji. W warunkach optymalnego stosunku ilości ATP do ADP izoforma o masie 46 kDa wykazywała minimalną zdolność do hydrolizy ATP oraz aktywacji RuBisCO w porównaniu do izoformy o masie 43 kDa. Ponadto tylko większa izoforma jest regulowana przez zmiany potencjału redoks komórki (Zhang i Portis, 1999).

Z kolei zidentyfikowane izoformy B aktywazy RuBisCO, które mogły być produktem genu *rcaB* cechowały się wyraźnym wzrostem w całej populacji mapującej oraz genotypach rodzicielskich i referencyjnych. W każdym z analizowanych genotypów jedna ze zidentyfikowanych izoform B aktywazy RuBisCO charakteryzowała się wyraźnym wzrostem poziomu akumulacji w roślinach poddanych działaniu suszy i stanowiła białko o najbardziej zróżnicowanym poziomie wzrostu, także pomiędzy genotypami rodzicielskimi. W zależności od genotypu zmiana w stosunku do kontroli zawierała się w przedziale od 2 do 15 (ryc. 4.9. A). Tak duże zróżnicowanie tego białka mogło być związane z potencjałem genetycznym danej linii do przeżywania w warunkach niedoboru wody. Ponadto to białko charakteryzowało najsilniejszą interakcją genotyp x susza (tab. 4.12, ryc. 4.18). Wyraźny wzrost poziomu akumulacji tej izoformy może świadczyć także o jej większym zaangażowaniu w proces stymulacji RuBisCO do wiązania większej ilości CO₂ w warunkach jego niedoboru w porównaniu do izoformy A tego białka. Wykazano, że aktywaza RuBisCO w warunkach stresu spełnia dodatkową funkcję białka opiekuńczego, którego rola polega na utrzymywaniu i poprawnej translacji białek tylakoidów uczestniczących w fotosyntezie (Rokka i in., 2001).

Zmiany poziomu akumulacji aktywazy RuBisCO (bez zróżnicowania na izoformy) były obserwowane m.in. u pszenicy (Caruso i in., 2009), jęczmienia (Kausar i in., 2013) czy ryżu (Salekdeh i in., 2002) poddanych działaniu suszy. Natomiast fluktuacje poziomu ekspresji genu izoformy B były obserwowane w np. u pszenicy (Wang i in., 2011), a na

poziomie samego białka u bawełny (Law i Crafts-Brandner, 2001) i jęczmienia (Rollins i in., 2013), ale w kontekście wysokich temperatur. Z przeglądu literatury wynika, że izoforma B aktywazy RuBisCO nie była dotąd identyfikowana jako białko uczestniczące w odpowiedzi na suszę. Powodem tego może być fakt, że w większości publikacji, w których opisywane są wyniki badań wpływu różnych czynników abiotycznych na proteom roślin, zwykle nie rozróżniano izoform tego białka, co prawdopodobnie wynikało z dysponowania w tym czasie niewystarczającymi metodami identyfikacji. W przypadku moich badań zarówno technika peptydowego odcisku palca, jak i widma fragmentacyjne pozwoliły na jednoznaczne rozróżnienie obu izoform. Co ciekawe, w pracy dotyczącej zmian proteomu liści jęczmienia pod wpływem suszy, a także wysokich temperatur i kombinacji obu czynników, istotne zmiany dla izoformy B aktywazy RuBisCO były obserwowane wyłącznie w stresie wysokich temperatur oraz dla kombinacji obu stresów. Isoforma B wykazywała znaczny wzrost poziomu akumulacji, podczas gdy dla izoformy A odnotowano wyraźne spadki. Natomiast w warunkach niedoboru wody nie odnotowano zmian nie tylko dla tych enzymów, ale także dla całego proteomu (Rollins i in., 2013). Należy jednak podkreślić, że zastosowane parametry suszy były umiarkowane, co mogło być powodem różnic w otrzymanych wynikach i jednocześnie sugeruje większe znaczenie izoformy B aktywazy RuBisCO w długotrwałej suszy o dużej intensywności, jakiej poddano populację mapującą MCam, genotypy rodzicielskie i referencyjne.

Otrzymane wyniki nie pozwalają na uzyskanie pełnej odpowiedzi na temat konkretnej funkcji pełnionej przez określone izoformy aktywazy RuBisCO, nie mniej jednak poziom akumulacji izoformy B bardzo silnie korelował z dwiema izoformami białka wiążącego światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego (ryc. 4.10, ryc. 4.18), które biorą udział w kontroli poprawności fałdowania nowo zsyntetyzowanych białek. Na tej podstawie można spekulować, że główną funkcją izoformy B w suszy jest rola białka opiekuńczego w syntezie białek tylakoidów, która została zaproponowana w stresie wysokich temperatur (Rokka i in., 2001).

Anhydraza węglanowa, zlokalizowana głównie w stromie chloroplastu, odgrywa znaczącą rolę w fotosyntezie poprzez ułatwianie dyfuzji CO₂ w poprzek błony chloroplastu. Zwiększony poziom akumulacji tego enzymu w znacznej części badanych genotypów jęczmienia mógł być spowodowany ograniczoną dostępnością CO₂ w komórkach mezofilu będącą skutkiem zamknięcia aparatów szparkowych w celu zmniejszenia transpiracji i minimalizacji strat wody. Wykazano, że aktywność tego enzymu spada w warunkach podwyższonego stężenia CO₂, natomiast w warunkach niskiego stężenia CO₂ ulega wzrostowi

(Majeau i Coleman, 1996). Rola tego białka podczas ograniczonej dostępności CO_2 polega na katalizowaniu dehydratacji jonów HCO_3^- i aktywnym transporcie CO_2 do określonych miejsc w komórce w celu zapewnienia wysokiego stężenia CO_2 w otoczeniu RuBisCO, koniecznego do zajścia procesu karboksylacji katalizowanego przez ten enzym podczas ciemnej fazy fotosyntezy (Moroney i in., 2011). W innych badaniach dotyczących jęczmienia również potwierdzono znaczny wzrost aktywności anhidrazy węglanowej w warunkach niedoboru wody oraz po traktowaniu roślin kwasem abscysynowym, co dodatkowo wskazuje na potencjalny udział fitohormonu w modyfikowaniu aktywności tego enzymu (Popova i in., 1996).

W roślinach poddanych działaniu suszy, aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu charakteryzowała się niższym poziomem akumulacji w porównaniu do roślin wzrastających w warunkach optymalnych. Białko to uczestniczy w fazie ciemnej fotosyntezy – cyklu Calvin, a jego izoforma w glikolizie. Aktywność tego enzymu jest determinowana wyłącznie przez stosunek jego ekspresji do degradacji i przypuszcza się, że posiada on większą zdolność regulacji cyklu Calvin niż pozostałe enzymy biorące w nim udział (Graciet i in., 2004).

Duże spadki w poziomie akumulacji obserwowano także dla wszystkich zidentyfikowanych izoform dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, która również uczestniczy w cyklu Calvin.

Te wyniki świadczą o obniżeniu efektywności fazy ciemnej, co prawdopodobnie jest konsekwencją obniżonego wiązania CO_2 przez RuBisCO. Ponadto wykazano, że enzymy uczestniczące w cyklu Calvin są wrażliwe na działanie reaktywnych form tlenu, a zwłaszcza dehydrogenazy, które posiadają odsłonięte grypy tiolowe, co może być drugą przyczyną obserwowanego obniżenia względnej ilości tych enzymów (Takeda i in., 1995).

Obserwowane profile akumulacji różnych podjednostek syntazy ATP w badanej populacji mapującej nie były jednoznaczne, chociaż większość ze zidentyfikowanych podjednostek alfa i beta tego enzymu zlokalizowanego w chloroplastach charakteryzowała się wzrostem w części badanych genotypów i jednej z odmian rodzicielskich - Cam/B1/CI, podczas gdy w zdecydowanej większości linii rekombinacyjnych poziom akumulacji nie uległ istotnym zmianom, co może sugerować, że ograniczenie fotosyntezy w suszy nie jest wynikiem obniżonej produkcji ATP (Cornic, 2000).

Susza wpłynęła nie tylko na enzymy bezpośrednio uczestniczące w asymilacji węgla, ale także na białka fotosystemu I i II. Spadki poziomu akumulacji izoform białka kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II, w którym zachodzi rozszczepienie cząsteczki wody i wydzielenie tlenu, a także kilku izoform oksydoreduktazy NADP^+ : ferredoksyna, ostatniego

enzymu w łańcuchu transportu elektronów z fotosystemu I na NADPH podczas fazy jasnej fotosyntezy, mogły być spowodowane uruchomieniem mechanizmu polegającego na zmniejszeniu wydajności transportu elektronów. W efekcie pozwoliłoby to na dopasowanie możliwości aparatu fotosyntetycznego do warunków zmniejszonego stężenia CO₂ i zabezpieczenia go przed nadmierną ilością docierającej energii i generowaniem wolnych rodników (Lu i Zhang, 1999). O zmniejszeniu efektywności transportu elektronów świadczą także odnotowane spadki względnej ilości cytochromu b6f w znacznej części badanych genotypów populacji mapującej i odmianach referencyjnych. Z drugiej jednak strony w części linii hodowlanych populacji mapującej oraz odmianach rodzicielskich dwie inne izoformy oksydoreduktaz NADP⁺ : ferredoksyna charakteryzowały się dodatnim efektem suszy, co może mieć związek z ich rolą w usuwaniu skutków stresu oksydacyjnego (Krapp i in., 1997).

Susza wpłynęła znacząco na enzymy biorące udział w metabolizmie węgla, m.in. w glikolizie i cyklu kwasów trikarboksylowych (ryc. 4.6., 4.8., 4.13., tab. 4.10., 4.11., 4.14.). W analizie odmian rodzicielskich i referencyjnych odpowiedź białek związanych z tą kategorią w Cam/B1/CI była odmienna w porównaniu do pozostałych trzech europejskich, co mogło być związane z różnicami w pochodzeniu geograficznym roślin i lepszym przystosowaniem odmiany syryjskiej do wzrostu w warunkach niedoboru wody (tab. 4.6., ryc. 4.2.). W analizie profili akumulacji białek w liniach populacji mapującej, podobnie jak w Cam/B1/CI, przeważał dodatni efekt suszy dla białek zakwalifikowanych do kategorii związanej z metabolizmem węgla (tab. 4.14.), co było także widoczne w pojedynczych analizach 100 linii populacji MCam (ryc. 4.8.).

Enolaza, przedostatni enzym szlaku glikolizy jest kontrolowana przez czynnik DREB1 (ang. *dehydration responsive element binding 1*) (Seki i in., 2002), który reguluje ekspresję wielu genów związanych z odpowiedzią na suszę i odgrywa ważną rolę w nabywaniu przez rośliny tolerancji na ten stres (Lata i Prasad, 2011). W przypadku linii rekombinacyjnych populacji mapującej obserwowano przeważnie wzrost lub brak zmiany poziomu akumulacji tego enzymu. Ponadto profil ekspresji enolazy różnicował odmiany rodzicielskie. Roślina z gatunku przypołudnika (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) w warunkach suszy lub wysokiego zasolenia w celu lepszego gospodarowania dostępną wodą jest zdolna do zmiany fotosyntezy typu C3 na fotosyntezę typu CAM (ang. *Crassulacean Acid Metabolism*), przez co charakteryzuje się wysoką odpornością na te stresy (Lüttge, 1993). W liściach tej rośliny, wzrastającej w warunkach podwyższonego stężenia soli, obserwowano wzrost aktywności enolazy, a w suszy i stresie niskich temperatur także ilości transkryptu tego białka, co świadczy o jego dużej roli w procesie adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska

(Forsthoefel i in., 1995). Zwiększenie poziomu akumulacji enolazy w odmianie syryjskiej Cam/B1/CI oraz części linii rekombinacyjnych populacji mapującej w porównaniu do roślin kontrolnych mogło mieć związek z ich lepszą adaptacją do warunków ograniczonej dostępności wody. Z drugiej strony dla kilku izoform innego enzymu glikolitycznego – izomerazy triozofosforanowej, nie obserwowano znaczących zmian w poziomie akumulacji w analizowanych genotypach, chociaż w badaniach przeprowadzonych w innych laboratoriach enzym ten wykazywał wzrost względnej ilości w roślinach wzrastających w warunkach niedoboru wody (Riccardi i in., 1998; Salekdeh i in., 2002). Różnice w uzyskanych wynikach mogły być spowodowane odmiennymi warunkami stosowanymi podczas prowadzonej hodowli roślin. W obu przytoczonych pracach rośliny poddawano progresywnej suszy, która mogła w większym stopniu wpłynąć na zaburzenie metabolizmu podstawowego.

W zdecydowanej większości genotypów populacji mapującej poziom akumulacji enzymów uczestniczących w szlaku Krebsa – dehydrogenazy jabłczanowej oraz dehydrogenazy izocytrynianowej pozostał bez zmian. Jednakże, różnicował on odmianę Cam/B1/CI od Maresi i dwóch pozostałych odmian referencyjnych, na co mogły mieć wpływ różnice w pochodzeniu odmian i co za tym idzie, ich przystosowaniu do wegetacji w warunkach niedoboru wody. W pracach poświęconych badaniom wpływu suszy na zmiany proteomu jęczmienia obserwowano wzrost względnej ilości dehydrogenazy jabłczanowej tylko w odmianach odpornych, podczas gdy w odmianach wrażliwych odnotowano spadek bądź brak istotnej zmiany (Ashoub i in., 2013; Kausar i in., 2013).

Zmiany profilu akumulacji enzymów uczestniczących w glikolizie, cyklu Krebsa oraz innych szlakach metabolizmu węgla spowodowane suszą należą do często obserwowanych przez badaczy, jednakże kierunek tych zmian nie zawsze jest jednolity (Kausar i in., 2013; Plomion i in., 2006; Salekdeh i in., 2002). Obniżenie poziomu akumulacji i aktywności enzymów glikolitycznych w odpowiedzi na niedobór wody może np. stanowić mechanizm prowadzący do akumulowania cukrów, które zostaną wykorzystane jako źródło energii do wzrostu rośliny dopiero po ustąpieniu stresu (Plomion i in., 2006). Z drugiej jednak strony wzrost profilu akumulacji enzymów glikolitycznych może być związany z większym zapotrzebowaniem rośliny na energię niezbędną do aktywacji mechanizmów obronnych związanych np. z syntezą osmolitów, usuwaniem wolnych rodników i utrzymaniem homeostazy, zwłaszcza w warunkach obniżonej wydajności fotosyntezy (Salekdeh i in., 2002). Te pozornie sprzeczne rezultaty mogą być rezultatem różnic wynikających z warunków eksperymentalnych, w których występuje zwykle bardzo dużo zmiennych

związanych m.in. z wyborem odmian wykorzystywanych do badań, ich tolerancją na niedobór wody, a także parametrami dotyczącymi samej suszy, jej intensywności czy czasu trwania.

W badanych roślinach jęczmienia poddanych działaniu suszy nastąpiło uruchomienie szeregu różnorodnych reakcji obronnych, o czym świadczą zmiany poziomu akumulacji wielu białek zakwalifikowanych do tej kategorii (ryc. 4.6., 4.8., 4.13., tab. 4.10., 4.11., 4.14.). W analizie 4 odmian, podobnie jak w przypadku białek uczestniczących w metabolizmie węgla, ogólny profil zmian białek związanych z reakcjami obronnymi różnicował Cam/B1/CI od Maresi, Sebastiana i Stratusa. W trzech ostatnich przeważał spadek poziomu akumulacji białek tej kategorii w porównaniu do roślin kontrolnych (tab. 4.6.). Różnice pomiędzy odmianami rodzicielskimi zostały także potwierdzone w analizie całościowej profili wyselekcjonowanych białek (tab. 4.17.). Taki kontrast w odpowiedzi pomiędzy odmianą syryjską i trzema europejskimi ponownie sugeruje związek pomiędzy pochodzeniem i adaptacją roślin do warunków niedoboru wody (ryc. 4.2.).

Białka spełniające funkcje obronne w analizowanych genotypach populacji mapującej w zdecydowanej większości charakteryzowały się wzrostem poziomu akumulacji (ryc. 4.8.), a w analizie niecelowanej, aż 32 z 40 wykazywało istotny statystycznie efekt suszy (tab. 4.12.). O uruchomieniu mechanizmów obronnych świadczy również fakt, że liczba białek w tej kategorii wykazujących dodatni efekt suszy była o wiele większa niż spodziewana proporcja w odniesieniu do wszystkich białek (tab.4.14.). Ponadto analiza współrzędnych głównych PCA dla białek związanych z reakcjami obronnymi ujawniła istotne różnice w poziomie akumulacji białek pomiędzy roślinami wzrastającymi w warunkach optymalnych i niedoboru wody (ryc. 4.16.), jednakże PCA dla obliczonego efektu suszy tych białek nie dowiodła istnienia znaczącego zróżnicowania w odpowiedzi na niedobór wody pomiędzy liniami populacji mapującej, co wskazuje na konserwatywną reakcję na suszę (ryc.4.17.). Nie mniej jednak, dla 13 białek zostały znalezione istotne statystycznie zależności pomiędzy odpowiedzią na suszę poszczególnych genotypów (interakcja susza x genotyp) (tab. 4.15.).

W roślinach, które są narażone na działanie różnych niekorzystnych czynników biotycznych i abiotycznych dochodzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników. W trakcie suszy głównym miejscem ich wytwarzania jest chloroplast. Obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia CO₂ spowodowanego zamknięciem aparatów szparkowych w znacznym stopniu przyczynia się do spowolnienia przebiegu fotosyntezy. Docierająca energia słoneczna nie może zostać całkowicie wykorzystana w fazie jasnej tego procesu, co prowadzi do zaburzeń w łańcuchu przenośników elektronowych i w efekcie do generowania

dużej ilości reaktywnych form tlenu (RFT) (Gill i Tuteja, 2010). Ich nadmiar jest toksyczny dla rośliny i powoduje liczne uszkodzenia biopolimerów oraz struktur komórkowych. Należy jednak zaznaczyć, że wolne rodniki posiadają także drugą funkcję związaną z przekazywaniem sygnałów i aktywowaniem mechanizmów obronnych (Dat i in., 2000).

Rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalającym im na sprawne usuwanie RFT i innych rodników, m.in. cykl woda/woda w chloroplastach (Asada, 1999), cykl askorbinianowo-glutationowy (Foyer i Halliwell, 1976), a także reakcje związane z aktywnością peroksydaz oraz katalaz (Mittler, 2002).

Manganianowa dysmutaza ponadtlenkowa jest enzymem przekształcającym O_2^- do H_2O_2 . Zmiany poziomu akumulacji tego białka różnicowały poszczególne linie populacji mapującej. Dla większości badanych linii hodowlanych populacji MCam względna ilość tego enzymu nie zmieniła się, jednakże dla części odnotowano wzrost poziomu akumulacji, co może świadczyć o sprawniejszym usuwaniu tej reaktywnej formy tlenu w tych genotypach. Wyniki licznych badań wskazują na dużą rolę dysmutazy ponadtlenkowej w nabywaniu przez rośliny tolerancji na suszę (Bowler i in., 1992). Zwiększona aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była obserwowana w odmianach odpornych jęczmienia (Acar i in., 2001) oraz ciecierzycy wzrastających w warunkach niedoboru wody (Subba i in., 2013). Z kolei zwiększonym poziomem akumulacji cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej charakteryzowały się siewki pszenicy zarówno odporne i wrażliwe na niedobór wody, chociaż w jednej z odmian tolerujących suszę obserwowany wzrost był o wiele wyraźniejszy (Ford i in., 2011). W analizie porównawczej dwóch odmian jęczmienia poddanych działaniu kadmu oraz aluminium obserwowany wzrost aktywności dysmutazy był większy w odmianie odpornej (Guo i in., 2004). Natomiast ekspresja manganianowej dysmutazy ponadtlenkowej z grochu spowodowała zwiększenie tolerancji na suszę siewek ryżu, która objawiała się mniejszym spadkiem fotosyntezy oraz mniejszym wyciekami elektronów bezpośrednio na tlen w porównaniu do typu dzikiego (Wang i in., 2005).

Peroksydaza askorbinianowa jest pierwszym enzymem cyklu askrobinianowo-glutationowego, który odgrywa kluczową rolę w usuwaniu H_2O_2 , natomiast chloroplastowa izoforma tego enzymu jest zaangażowana w cykl woda/woda (Asada, 1999). W obu szlakach kwas askorbinowy jest wykorzystywany jako donator elektronów do redukcji H_2O_2 do cząsteczki wody. W cyklu askrobinianowo-glutationowym, glutation i pozostałe enzymy tego szlaku: reduktaza monodehydroaskorbinianowa, reduktaza dehydroaskorbinianowa oraz reduktaza glutationowa biorą udział w recyklingu utlenionego kwasu askorbinowego. W genotypach rodzicielskich oraz większości linii populacji mapującej peroksydaza

askorbinianowa charakteryzowała się dodatnim efektem suszy, jednakże dla dwóch innych enzymów tego szlaku: reduktazy glutationowej oraz reduktazy dehydroaskorbinianowej w przeważającej liczbie genotypów nie obserwowano istotnej zmiany względnej ilości w porównaniu do roślin kontrolnych. Może to wskazywać na kluczowe znaczenie pierwszego etapu tego cyklu. Wzrost poziomu akumulacji peroksydazy askorbinianowej został także odnotowany w innych badaniach wpływu niedoboru wody na jęczmień, gdzie dotyczył obu badanych odmian, jednakże był wyraźniejszy w odmianie odpornej (Wendelboe-Nelson i Morris, 2012).

Chloroplast jest szczególnie narażony na uszkodzenia spowodowane fotosyntetycznym transportem elektronów oraz produkcją tlenu, zwłaszcza w warunkach obniżonej wydajności fotosyntetycznej (Asada, 2006). W kilku liniach rekombinacyjnych populacji M_{Cam} odnotowano znaczący spadek względnej ilości chloroplastowej peroksydazy askorbinianowej. Chloroplastowy cykl woda/woda zależny od tego enzymu jest wrażliwy na inaktywację wynikającą z nadmiaru wolnych rodników i z tego względu może nie zapewniać wystarczającego poziomu ochrony aparatu fotosyntetycznego przed stresem oksydacyjnym spowodowanym suszą (Shikanai i in., 1998).

Peroksyredoksyny stanowią rozległą rodzinę białek, która bierze udział w neutralizowaniu H₂O₂, a także nadtlenków alkilowych i reaktywnych form azotu przez co stanowią ważny składnik systemów usuwania skutków stresu oksydacyjnego. Ponadto uczestniczą w przekazywaniu sygnałów zależnych od tlenku azotu i nadtlenku wodoru (Alikhani i in., 2013; Dietz, 2006). Dla kilku izoform peroksyredoksyny dwucysteinowej obserwowano wzrost lub brak istotnej zmiany w genotypach rodzicielskich i ich potomstwie. W przypadku peroksyredoksyny IIE, również występującej w chloroplastach, dodatnim efektem suszy charakteryzowała się blisko połowa badanych genotypów jęczmienia, chociaż w jednej z prac dotyczących funkcjonalnej analizy tego enzymu stwierdzono, że nie jest on zaangażowany w odpowiedź roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe, w tym deficyt wody (Gama i in., 2008). Powodem takiej rozbieżności wyników mogły być zastosowane warunki suszy, która w przypadku badań cytowanej pracy trwała niemal o połowę krócej. Z kolei wzrost poziomu akumulacji peroksydazy dwucysteinowej w roślinach poddanych działaniu suszy obserwowano już wcześniej, m.in. w liściach buraka cukrowego (Hajheidari i in., 2005) i ryżu (Ali i Komatsu, 2006). Oba enzymy są chloroplastowymi białkami, które uczestniczą w zmniejszaniu skutków stresu oksydacyjnego. Ich specyficzność substratowa jest szeroka i oprócz neutralizowania H₂O₂, biorą również udział w detoksykacji reaktywnych nadtlenków azotu (Dietz i in., 2002). Przypuszcza się także, że uczestniczą w regulacji

ścieżek sygnałnych, w których kluczową rolę odgrywają rodniki azotowe i tlenowe (Romero-Puertas i in., 2007). Szlak usuwania wolnych rodników, w którym uczestniczy peroksydaza dwucysteinowa określa się mianem alternatywnego cyklu woda/woda, który oprócz detoksykacji reaktywnych związków, odgrywa ważną rolę w rozpraszaniu nadmiaru energii docierającej do chloroplastów, przez co wpływa na ochronę aparatu fotosyntetyczny przed fotoinhibicją (Dietz i in., 2002).

S-transferazy glutationu stanowią ważną grupę enzymów biorących udział w detoksykacji produktów stresu oksydacyjnego, a ich aktywność w roślinach jest regulowana m.in. przez H_2O_2 (Dixon i in., 2011). Zmiany poziomu akumulacji dwóch spośród trzech zidentyfikowanych izoform tego białka różnicowały badane genotypy populacji mapującej, w której dla części z nich obserwowano wzrost profilu akumulacji. Nadekspresja genu kodującego S-transferazę glutationu w tytoniu spowodowała wzrost dostępnej ilości kwasu askorbinowego i glutationu, a także enzymów szlaku askrobinianowo-glutationowego, co jednocześnie wpłynęło na zwiększenie możliwości usuwania H_2O_2 przez ten system i zmniejszenie uszkodzeń spowodowanych stresem oksydacyjnym (Liu i in., 2013; Roxas, 2000).

Lipokailina, która wykazywała dodatni efekt suszy w znacznej części badanych genotypów jęczmienia, również jest zaangażowana w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym. Rodzina lipokalin należy do białek wiążących małe, często hydrofobowe cząsteczki (Frenette Charron, 2005). Mutanty *Arabidopsis thaliana*, w których nie zachodziła ekspresja genu kodującego chloroplastową lipokalinę, wykazywały zwiększoną podatność na uszkodzenia oksydacyjne aparatu fotosyntetycznego wywołanego suszą, nadmiernym światłem i herbicydem. Niekorzystne czynniki środowiskowe spowodowały m.in. zwiększony poziom peroksydacji lipidów wywołany nadmierną ilością tlenu singletowego. Natomiast w roślinach z nadekspresją genu lipokaliny skutki tych stresów były o wiele mniejsze niż w roślinach typu dzikiego, a poziom peroksydacji lipidów pozostał na niskim poziomie, co wskazuje na zaangażowanie tego białka w ochronę błony tylakoidów przed działalnością wolnych rodników (Levesque-Tremblay i in., 2009).

W ponad połowie badanych genotypów obserwowano wzrost poziomu akumulacji glioksalazy I, jednego z dwóch enzymów biorących udział w detoksykacji metyloglioksalu. W warunkach fizjologicznych ten związek powstaje jako produkt uboczny w procesie glikolizy i cyklu Calvina oraz podczas biosyntezy treoniny. Glioksalaza I katalizuje przekształcenie metyloglioksalu do S-laktoiloglutationu wykorzystując do tego zredukowany glutation jako kofaktor tej reakcji. S-laktoiloglutation jest następnie hydrolizowany przez

glioksalazę II do D-mleczanu (Thornalley, 1996). W stresach abiotycznych, takich jak susza czy zasolenie dochodzi nawet do 6-krotnego podwyższenia stężenia tego związku m.in. z powodu zwiększonego zapotrzebowania na ATP. W komórkach aktywnych metabolicznie, które doświadczają stresu osmotycznego, obserwuje się zwykle aktywację enzymów biorących udział w usuwaniu tego związku. Wysokie stężenie metyloglioksalu jest toksyczne dla komórek, ponieważ powoduje m.in. zahamowanie ich proliferacji oraz liczne reakcje z kwasami nukleinowymi, co może być przyczyną mutagenizacji. Ponadto związek ten wpływa na modyfikacje białek, zwiększając tym samym poziom ich degradacji. Możliwe jest również, że metyloglioksal odgrywa rolę w przekazywaniu sygnałów podczas zaistnienia stresu abiotycznego (Yadav i in., 2005a). W *Arabidopsis thaliana* susza spowodowała wzrost ilości transkryptu glioksalazy I (Seki i in., 2002), natomiast wzrost akumulacji białka obserwowano m.in. w odmianie odpornej jęczmienia wzrastającej w warunkach wysokiego zasolenia (Witzel i in., 2009). Transgeniczne rośliny tytoniu, które charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genu kodującego glioksalazę I w większym stopniu tolerowały stres osmotyczny niż rośliny kontrolne (Singla-Pareek i in., 2003), a jednoczesna nadekspresja obu enzymów metabolizujących metyloglioksal wzmocniła ten efekt (Yadav i in., 2005b). Oprócz usuwania metyloglioksalu zwiększona aktywność enzymów systemu glioksalaz odgrywa również rolę w recyklingu glutationu i utrzymywaniu odpowiedniego stosunku formy zredukowanej do utlenionej przez co wpływa na potencjał redoks komórki i utrzymanie homeostazy, a wykazano, że zwiększony poziom metyloglioksalu powoduje obniżenie poziomu zredukowanej formy glutationu (Yadav i in., 2005b). Obserwowany wzrost tolerancji na stres osmotyczny wywołany zasoleniem u roślin transgenicznych mógł być spowodowany większą dostępnością zredukowanego glutationu (Singla-Pareek i in., 2003), który stanowi jedną z podstawowych molekuł biorących udział w usuwaniu wielu różnych toksycznych produktów powstających w trakcie stresów abiotycznych, np. wolnych rodników oraz utrzymywaniu odpowiedniego poziomu i stopnia utlenienia innych składników systemu przeciwutleniaczy, np. kwasu askorbinowego (Alscher, 1989).

Zdolność roślin do sprawnego zarządzania metabolizmem reaktywnych form tlenu jest kluczowa dla zachowania optymalnego przebiegu procesów fizjologicznych. Ich nadmiar zakłóca homeostazę jonową, powodując nieodwracalne szkody dla rośliny. Wzmocniona aktywacja większej liczby enzymów oraz składników nieenzymatycznych systemów usuwania wolnych rodników jest ważnym aspektem determinującym poziom odporności na suszę i inne stresy abiotyczne (Ford i in., 2011; Peng i in., 2009; Wendelboe-Nelson i Morris, 2012).

Susza, podobnie jak inne stresy abiotyczne prowadzi do zaburzeń w syntezie i poprawnym fałdowaniu białek. Białka szoku cieplnego stanowią dużą rodzinę białek, które biorą udział w utrzymywaniu homeostazy w komórkach. Susza oraz inne stresy abiotyczne bardzo często prowadzą do indukcji tych białek (Wang i in., 2003). U roślin, podobnie jak u innych organizmach prokariotycznych i eukariotycznych wyróżnia się 5 klas tych białek, które klasyfikuje się na podstawie ich masy cząsteczkowej oraz homologii sekwencji aminokwasowej (Wang i in., 2004).

Białka szoku cieplnego o masie 100 kDa (HSP100/Clp) biorą udział w usuwaniu i reaktywacji zagregowanych lub źle sfałdowanych łańcuchów polipeptydowych. Białka szoku cieplnego o masie 90 kDa (HSP90) uczestniczą we właściwym fałdowaniu białek, a także w przekazywaniu sygnałów (Wang i in., 2004). Profil kilku zidentyfikowanych izoform podjednostki regulatorowej ClpC chloroplastowej kazeino-litycznej proteazy serynowej Clp (ang. *caseino-lytic protease*), białka należącego do klasy HSP100, w obrębie populacji mapującej oraz odmian rodzicielskich i referencyjnych nie był jednoznaczny. Natomiast sama proteaza (ClpP) różnicowała odmiany rodzicielskie. Domena regulatorowa ClpC kompleksu kazeino-litycznej proteazy serynowej Clp jest produktem genu *erd1* (ang. *early responsive to dehydration*), którego ekspresja zachodzi na wczesnych etapach suszy (Nakashima i in., 1997; Simpson i in., 2003). Uważa się, że ekspresja tego białka jest zasadnicza i konstytutywna i bierze udział w degradacji źle ufałdowanych białek, a także w imporcie prekursorów białek do chloroplastów, jednakże nie wiele wiadomo na temat funkcjonowania tego systemu i jego fizjologicznej roli w stresach abiotycznych (Rosano i in., 2011). W badaniach pszenicy wzrastającej w warunkach niedoboru wody obserwowano wzrost poziomu akumulacji proteazy Clp, jednakże potencjalny związek pomiędzy aktywnością tego kompleksu i tolerowaniem suszy nie jest jasny. Obserwowane zmiany ilości tego białka mogą być związane ze zmianami w fotosyntezie spowodowanymi suszą, a proteaza Clp może mieć wpływ na regulowanie ilości enzymu RuBisCO (Demirevska i in., 2008). W innych badań wpływu niedoboru wody na zmiany proteomu jęczmienia obserwowano wzrost poziomu akumulacji kilku białek z rodziny HSP90 i HSP100 zarówno w genotypie wrażliwym jak i tolerancyjnym na ten stres (Ashoub i in., 2013).

Susza spowodowała również zmiany poziomu akumulacji białek szoku cieplnego o masie 70kDa (HSP70), które m.in. zapobiegają agregacji nowo zsyntetyzowanych białek, a także są zaangażowane w ich transport oraz degradację. Kierunek zmian względnej ilości różnych izoform tych białek nie był jednolity. Dla kilku z nich, zlokalizowanych chloroplacie, obserwowano spadki poziomu akumulacji w odmianach rodzicielskich,

referencyjnych oraz części linii populacji mapującej. Jedna z izoform HSP70, która wykazywała ujemny efekt suszy, została zidentyfikowana jako prawdopodobny mediator podjednostki transkrypcyjnej polimerazy II RNA. Jest to część kompleksu białkowego, uczestniczącego w regulacji transkrypcji genów zależnych od polimerazy II RNA, np. małych białek szoku cieplnego. Podjednostki kompleksu mediatora spełniają szereg różnych funkcji regulatorowych związanych z odpowiedzią na stresy biotyczne i abiotyczne, procesami rozwojowymi i kwitnieniem, a także biorą udział w syntezie niekodujących RNA, metylacji rybosomalnego RNA oraz transporcie białek do chloroplastów (Kidd i in., 2011). Analiza transkryptomiczna wybranych podjednostek kompleksu mediatora w ryżu poddanego stresowi niskich temperatur, zasolenia oraz suszy ujawniła duże zróżnicowanie ekspresji ich genów w zależności od zastosowanego stresu, jednakże ich szczegółowa funkcja pozostaje bez wyjaśnienia (Mathur i in., 2011). Spadek akumulacji tego enzymu i innych izoform HSP70 może świadczyć o zaburzonej homeostazie w chloroplastach, a także wskazuje na obniżenie wydajności systemu wspomagającego właściwe fałdowanie białek i zapobiegającemu ich agregacji w tym organellum, co mogło być efektem zaburzeń w fotosyntezie spowodowanych długą i intensywną suszą jakiej poddanej zostały rośliny. W innych badaniach wpływu suszy na jęczmień spadek poziomu akumulacji białka HSP70 obserwowano tylko w odmianie wrażliwej na niedobór wody, podczas gdy odmiana odporna charakteryzowała się wzrostem poziomu akumulacji jednej z izoform tego białka (Kausar i in., 2013). Spadki poziomu akumulacji białek HSP70 były również obserwowane w analizie skutków suszy w proteomie liścia buraka cukrowego (Hajheidari i in., 2005). Susza spowodowała także wzrost poziomu kilku innych izoform HSP70 w liniach hodowlanych populacji mapującej, odmianach rodzicielskich i referencyjnych. Wśród nich zidentyfikowano dwie izoformy białka wiążącego światła (wnętrza) retikulum endoplazmatycznego, które podobnie jak inne białka z rodziny HSP70 biorą udział w fałdowaniu białek, ale również stanowią mechanizm kontroli poprawności zwijania syntetyzowanych białek w tym organellum. Mechanizm kontroli polega na rozpoznaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek i kierowaniu ich poza retikulum do degradacji (Valente i in., 2009). Susza, podobnie jak inne stresy abiotyczne prowadzi do zaburzeń w homeostazie retikulum endoplazmatycznego, które m.in. przejawiają się wzrostem ilości źle sfałdowanych lub nieufałdowanych białek w świetle retikulum, powodując zaburzenie równowagi pomiędzy wymaganą ilością funkcjonalnych białek i zdolnością retikulum endoplazmatycznego do przeprowadzania prawidłowego procesu fałdowania nowopowstających białek. Reakcją na stres retikulum jest aktywacja kaskady odpowiedzi na nieufałdowane białka (UPR, *ang. unfolded protein response*), dzięki

której następuje przywrócenie równowagi pomiędzy możliwościami fałdowania białek i ich sekrecją. Dochodzi do zahamowania syntezy białka na poziomie transkrypcji i translacji, co powoduje zmniejszenie „obciążenia” retikulum oraz prowadzi do wzrostu akumulacji białek opiekuńczych, co przekłada się na zwiększenie zdolności do fałdowania białek w tym organelum (Ma i Hendershot, 2004). Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego odgrywa główną rolę sensora nieprawidłowo sfałdowanych białek i regulatora aktywności kaskady UPR (Malhotra i Kaufman, 2007). Obie izoformy białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego niemal we wszystkich badanych genotypach jęczmienia wykazywały wzrost poziomu akumulacji i silną korelację względem siebie, a także względem izoformy B aktywazy RuBisCO (ryc. 4.10.). Taki wynik świadczy o znacznych podobieństwach w profilu odpowiedzi tych białek. Obie izoformy charakteryzowały się również silną interakcją genotyp $\times$ susza (tab. 4.12., ryc. 4.18.), co objawiało się dużymi różnicami we wzroście akumulacji pomiędzy poszczególnymi genotypami (ryc. 4.9., tab. 4.10.). Tak duże zróżnicowanie w profilu akumulacji tych białek w analizowanych genotypach może być związane z poziomem tolerancji na suszę poszczególnych linii populacji mapującej, odmian rodzicielskich i referencyjnych.

W badaniach wpływu niedoboru wody na soję (*Glycine max* (L.) Merr) oraz tytoń, rośliny z nadekspresją genu kodującego białko wiążące retikulum endoplazmatycznego (*soyBiPD*) charakteryzowały się tylko niewielkim spadkiem względnej zawartości wody w liściach w porównaniu do typu dzikiego, którego liście więdły po ekspozycji na stres. Podczas suszy aparaty szparkowe roślin z nadekspresją genu *soyBiPD* w mniejszym stopniu uległy zamknięciu, a spadek fotosyntezy i transpiracji był o wiele mniejszy niż w roślinach kontrolnych. Z kolei w roślinach z wyższą ekspresją białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego nie zaobserwowano typowych zmian zachodzących pod wpływem suszy jak np. wzrost poziomu akumulacji osmolitów czy masy korzeni. Ponadto poziom ekspresji kilku genów, które są indukowane suszą nie uległ znacznemu wzrostowi w roślinach z nadekspresją genu *soyBiPD* w porównaniu do roślin kontrolnych. Taki wynik sugeruje istnienie odmiennego mechanizmu nabywania tolerancji przez te rośliny, który prawdopodobnie jest związany z funkcjonowaniem retikulum endoplazmatycznego (Valente i in., 2009). Podobne wyniki uzyskano dla transgenicznego tytoniu, charakteryzującego się nadekspresją sojowego genu kodującego białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego. W czasie trwania suszy wysoki poziom tego białka spowodował wzrost poziomu tolerancji na deficyt wody. W roślinach z nadekspresją genu *soyBiPD* poddanych działaniu suszy szybkość fotosyntezy nie zmieniła się w przeciwieństwie do roślin typu

dzikiego oraz posiadających sekwencję antysensowną tego genu, w których obserwowano drastyczny spadek asymilacji CO₂. Ponadto w roślinach z sekwencją antysensowną nastąpiła wyraźna indukcja mechanizmów związanych z usuwaniem wolnych rodników, natomiast w tytoniu z nadekspresją genu *soyBiPD* nie obserwowano wzrostu aktywności dysmutazy nadadtlenkowej, co sugeruje, że to białko opiekuńcze może mieć także wpływ na obniżenie endogennego stresu oksydacyjnego (Alvim i in., 2001). Rola białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego w tolerowaniu suszy może być także związana utrzymaniem integralności błony tego przedziału komórkowego i zapewnieniem właściwej struktury białek oraz wysokiej aktywności wydzielniczej. Wykazano, że to białko oddziałuje z białkami indukowanymi niedoborem wody i ułatwia ich fałdowanie (Cascardo i in., 2000). Ponadto może przyczyniać się do wydajniejszego kontrolowania poziomu akumulacji białek uczestniczących w mechanizmach ochronnych, dzięki czemu zabezpiecza komórki przed negatywnymi skutkami stresu zanim osiągnie on maksymalny efekt (Alvim i in., 2001).

Grupa białek szoku cieplnego o masach nie przekraczających z reguły 20 kDa (sHSP, ang. *small heat shock protein*) jest najbardziej zróżnicowana pod względem homologii, funkcji i lokalizacji komórkowej (Wang i in., 2004). Obserwowane spadki chloroplastowej izoformy jednego z nich w przeszło połowie genotypów populacji mapującej i formach rodzicielskich również potwierdzają zaburzenia związane z fałdowaniem białek w tym organellum, a także mogą być powiązane ze spadkami poziomu akumulacji HSP70 (Wang i in., 2004). Wykazano, że małe białka szoku cieplnego biorą udział w fałdowaniu białek szoku cieplnego o masie 70 kDa (Lee i Vierling, 2000).

Niejednoznaczne zmiany obserwowanych izoform białek szoku cieplnego w znacznym stopniu utrudniają interpretację biologiczną w kontekście określenia ich roli jaką odgrywają podczas suszy czy innego stresu abiotycznego, zwłaszcza, że ta rodzina białek jest bardzo zróżnicowana zarówno pod względem strukturalnym, jak i pełnionych przez nie funkcji. Scharakteryzowanie procesu biologicznego, w którym dane białko szoku cieplnego bierze udział wymaga bardziej szczegółowej identyfikacji pozwalającej na określenie nazwy enzymu, a nie tylko ustalenia rodziny HSP do której przynależy, tak jak w kilku przypadkach tej analizy, np. białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego (HSP70).

Innym zidentyfikowanym enzymem, który bierze udział w kontroli poprawności fałdowania białek była metaloproteaza cynkowa FtsH zależna od ATP. Poziom akumulacji jednej z izoform tego białka wykazywał dodatni efekt suszy w znacznej części badanych linii rekombinacyjnych i odmianach rodzicielskich. Wykazano, że metaloproteaza FtsH uczestniczy w degradacji uszkodzonego pod wpływem nadmiaru światła i ciepła białka D₁,

w fotosystemu II, będącego miejscem przyłączania akceptora elektronów – plastochinonu B (Nixon, 2004; Yoshioka i in., 2006). W analizie porównawczej dwóch kontrastujących pod względem odporności na suszę odmian wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.) zmiany profilu akumulacji metaloproteazy FtsH różnicowały oba genotypy. Wskazuje to na udział tego białka w tolerowaniu niedoboru wody przez rośliny (Xu i Huang, 2010).

Utrzymanie optymalnej aktywności enzymów i zapobieganie niewłaściwemu fałdowaniu nowo powstających białek, a także przeciwdziałanie ich agregacji, jest kluczowym zjawiskiem dla przetrwania rośliny w niekorzystnych warunkach środowiska. Zdolność do utrzymywania wysokiej aktywności białek biorących udział w procesach ochronnych oraz regulujących ich przebieg, a także współdziałanie z innymi systemami zaangażowanymi w mechanizmy obronne (np. systemy usuwania wolnych rodników czy enzymy zaangażowane w syntezę osmoprotektantów) mają duży wpływ na poziom tolerancji roślin na suszę i inne stresy abiotyczne. Szczegółowe wyjaśnienie mechanizmów, dzięki którym rośliny nabywają tolerancję na suszę i inne stresy wymaga pełniejszego zrozumienia roli białek opiekuńczych, szoku cieplnego oraz innych czynników uczestniczących w mechanizmach ochronnych, które odgrywają rolę regulatorów odczuwania stresu, przekazywania sygnałów oraz aktywacji genów (Wang i in., 2004).

Zastosowane w doświadczeniach warunki niedoboru wody spowodowały zmiany poziomu akumulacji enzymów uczestniczących w metabolizmie azotu (ryc. 4.6., 4.8., 4.13., tab. 4.10., 4.11., 4.14.). W analizie odmian rodzicielskich i referencyjnych profil akumulacji białek zaangażowanych w syntezę niektórych aminokwasów w Maresi był wyraźnie różny od profilu obserwowanego dla Cam/B1/CI, co ponownie potwierdza odmienną reakcję proteomów tych dwóch genotypów i podkreśla ich odrębne pochodzenie. Dla genotypów populacji mapującej nieznaczna większość białek zaangażowanych w metabolizm azotu charakteryzowała się dodatnim efektem suszy (ryc. 4.8, tab. 4.14.). Podobnie jak w przypadku fotosyntezy oraz mechanizmów obronnych, analiza PCO ujawniła istotne różnice profili białkowych pomiędzy roślinami wzrastającymi w warunkach kontrolnych i niedoboru wody (ryc. 4.16). Chociaż same genotypy pod względem metabolizmu azotu nie były zróżnicowane, co ponownie wskazuje na znaczne podobieństwa w odpowiedzi na suszę w pomiędzy nimi (ryc. 4.17.). Dla 5 spośród 11 białek związanych z metabolizmem azotu, dla których efekt suszy był istotny statystycznie (tab. 4.14.), zmiany ich poziomu akumulacji wykazywały dodatkowo istotne zróżnicowanie w obrębie linii populacji mapującej (tab. 4.15.). Na tej podstawie można sądzić o potencjalnym udziale tych białek w specyficzności reakcji na suszę

danego genotypu i ich wpływu na poziom odporności na niedobór wody poszczególnych linii populacji mapującej i pozostałych badanych odmian.

Kilka izoform syntazy metioninowej i S-adenozylotransferazy metioninowej zostało zidentyfikowanych jako białka, których poziom akumulacji zmienił się w suszy. Oba te enzymy są zaangażowane w metabolizm fragmentów jednowęglowych (cykl aktywnego metylu) (Hanson i Roje, 2001). Syntaza metioninowa katalizuje powstawanie metioniny, aminokwasu niezbędnego do rozpoczęcia translacji, który bierze także udział w cyklu aktywnego metylu, gdzie jest konwertowana do S-adenozylometioniny przez syntazę tego związku. S-adenozylometionina dostarcza grupy metylowe, niezbędne do syntezy białek, kwasów nukleinowych oraz wielu metabolitów, m.in. lignin, alkaloidów oraz związków osmotycznie czynnych jak np. betainy, poliole, poliaminy (Hanson i in., 2000). Odnotowany wzrost poziomu akumulacji niektórych izoform tych enzymów w części linii rekombinacyjnych populacji mapującej poddanych działaniu w suszy mógł świadczyć o zwiększonym zapotrzebowaniu na grupy metylowe, które z kolei mogły być wykorzystane do syntezy osmolitów i innych związków istotnych dla przeżycia roślin w warunkach stresu abiotycznego (Bohnert i Jensen, 1996). Indukcja genu syntazy metioninowej była także obserwowana w siewkach jęczmienia poddanych działaniu stresu solnego, suszy, niskich temperatur oraz traktowaniu kwasem abscysynowym i H_2O_2 . Ponadto w tych samych warunkach odnotowano również wzrost betainy glicynowej, co sugeruje wspólny mechanizm regulacji, a sama syntaza metioninowa może dodatkowo stanowić nośnik grupy metylowej w cyklu aktywnego metylu, niezbędnego do syntezy choliny, prekursora betainy glicynowej (Narita i in., 2004).

Reduktaza ferredoksyna-azotyn, syntetaza glutaminowa i dehydrogenaza glutaminianowa stanowią kluczowe enzymy zaangażowane w asymilację azotu w roślinach. Te same białka są również zaangażowane w fotosyntezę i metabolizm węgla. Syntetaza glutaminowa i dehydrogenaza glutaminianowa odgrywają główną rolę we włączaniu jonu amonowego, a także w utrzymywaniu odpowiedniego poziomu azotu i stopnia jego utlenienia w roślinach. Białka te są odpowiedzialne za dostarczenie kwasu glutaminowego, który jest substratem m.in. w syntezie proliny, stanowiącej ważny składnik osmoregulacji komórek w warunkach stresu osmotycznego (Wang i in., 2007). W części genotypów populacji mapującej obserwowano spadki akumulacji tych enzymów, jednakże w większości linii nie odnotowano istotnej zmiany. Stężenie azotu w liściach jest związane ze zdolnością asymilacji CO_2 . Wzrost poziomu i dostępności tego pierwiastka powoduje zwiększenie aktywności RuBisCO, co w efekcie wpływa na szybkość fotosyntezy (Llorens i in., 2003). Wykazano, że

wraz z postępującą suszą następuje stopniowe obniżanie poziomu azotu w liściach, które może korelować z uszkodzeniami składników aparatu fotosyntetycznego. W badaniach skutków suszy na roślinę z gatunku wydmuchrzycy (*Leymus chinensis* L.) wykazano, że obniżenie aktywności kluczowych enzymów asymilujących azot oraz poziomu tego pierwiastka w liściach ma negatywny wpływ na zdolność wiązania CO₂ w fotosyntezie i adaptację do warunków suszy. Taki wynik sugeruje, że enzymy zaangażowane w metabolizm azotowy mogą pełnić znaczną rolę w tolerowaniu suszy przez rośliny (Xu i Zhou, 2006).

Kwas glutaminowy stanowi również substrat w syntezie kwasu 5-aminolewulinowego, który jest prekursorem porfiryn. W roślinach wyższych ta reakcja stanowi etap, na którym jest regulowana biosynteza chlorofilu (Beale i Castelfranco, 1974). Obserwowany w części genotypów spadek akumulacji aminomutazy semialdehydu glutaminianowego, enzymu, którego produktem reakcji jest kwas 5-aminolewulinowy, sugeruje obniżenie wydajności syntezy chlorofilu, na co mogło mieć również wpływ zmniejszenie zawartości dostępnego glutaminianu, będące wynikiem zredukowanej aktywności syntetazy glutaminowej lub/i dehydrogenazy glutaminianowej, a także zaburzeniami w metabolizmie wolnych rodników (Aarti i in., 2007).

Związki osmotycznie czynne (kompatybilne) akumulują się w tkankach roślin w trakcie suszy i innych stresów abiotycznych i stanowią jeden z czynników zaangażowanych w nabywanie tolerancji przez roślinę na niekorzystne czynniki środowiskowe. Są to z reguły związki niskocząsteczkowe, dobrze rozpuszczalne i względnie nietoksyczne dla komórki nawet jeżeli występują w wysokich stężeniach. Biorą one udział m.in. w utrzymywaniu turgoru w komórce w trakcie stresu osmotycznego, są zaangażowane w stabilizowanie białek i innych biopolimerów, a także wykazują działanie ochronne na błony komórkowe. (Ashraf i Foolad, 2007; Wang i in., 2003). Związki osmotycznie czynne uczestniczą w usuwaniu reaktywnych form tlenu, jednakże, prawdopodobnie, nie mają wpływu na zachowanie optymalnych właściwości plonu podczas działania niekorzystnych warunków środowiska (Serraj i Sinclair, 2002). Betaina glicynowa i prolina stanowią dwa główne związki kompatybilne akumulujące się w roślinach pod wpływem stresów abiotycznych (Ashraf i Foolad, 2007).

Dehydrogenaza aldehydu betainowego, enzymu katalizującego bezpośrednią reakcję syntezy betainy glicynowej różnicowała odmianę Cam/B1/CI od Maresi i dwóch pozostałych odmian referencyjnych. Fakt ten może mieć związek z lepszym przystosowaniem się odmiany syryjskiej do warunków suszy. Wzrost poziomu akumulacji tej dehydrogenazy w Cam/B1/CI

może świadczyć także o wzmożonej syntezie betainy glicynowej, której podwyższone ilości często towarzyszą stresom powodującym dehydratację komórek (McCue i Hanson, 1990). Betaina glicynowa występuje w dużych ilościach w chloroplaście, gdzie odgrywa znaczącą rolę w stabilizowaniu błon tylakoidów, przez co wpływa na wydajność fotosyntetyczną rośliny. W wielu przypadkach, rośliny bardziej tolerancyjne na stres osmotyczny akumulują większe ilości tego związku niż odmiany wrażliwe. Podobnie rośliny transgeniczne z nadekspresją genów szlaku syntezy betainy glicynowej wykazują zwykle zwiększony poziom tolerancji na suszę i inne stresy abiotyczne (Chen i Murata, 2011). Przykładowo w tytoniu, który naturalnie nie syntetyzuje betainy glicynowej, nadekspresja pochodzącego ze szpinaku genu *badh* kodującego dehydrogenazę aldehydu betainowego spowodowała wzrost tolerancji na stres solny, który podobnie jak susza prowadzi do dehydratacji komórek i obniżenia zdolności wiązania CO₂ (Yang i in., 2008). Podobne wyniki uzyskano dla transgenicznej pszenicy, którą cechowała zwiększona tolerancja na suszę i działanie wysokich temperatur (Wang i in., 2010). W obu przypadkach, nadprodukcja betainy glicynowej przyczyniła się do wzrostu tolerancji aparatu fotosyntetycznego na działanie niekorzystnych czynników, m.in. poprzez zapobieganie uszkodzeniom lipidów i utrzymywaniu odpowiedniego stosunku nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach tylakoidów (Chen i Murata, 2011).

Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu, kluczowy enzym syntezy proliny, również różnicowała odmianę Cam/B1/CI od Maresi i dwóch pozostałych odmian referencyjnych. Prolina, podobnie jak betaina glicynowa, bardzo często się pojawia w kontekście stresów środowiskowych (Verbruggen i Hermans, 2008). Podwyższona ilość tego związku w komórkach może korelować ze wzrostem odporności na suszę i inne stresy osmotyczne. Świadczą o tym m.in. wyniki uzyskane dla transgenicznych roślin z nadekspresją genu *p5cs* kodującego syntazę delta-1-pirolino-5-karboksylanu (Kavi Kishor i in., 1995; Zhu i in., 1998). Jednakże z drugiej strony, próba korelacji stężenia proliny z poziomem tolerancji na suszę w siewkach jęczmienia nie dała zadowalających rezultatów i nie pozwoliła na ustalenie związku pomiędzy nimi (Hanson i in., 1977). Z kolei w innych badaniach wykazano, że wzrost akumulacji proliny korelował wyłącznie z intensywnością stresu (Sofa i in., 2004). Ponadto udowodniono, że bardzo wysokie stężenia proliny są toksyczne dla rośliny i prowadzą do aktywacji katabolizmu tego związku oraz obniżenia szybkości jego syntezy (Hellmann i in., 2000), z czym mogły być związane spadki akumulacji syntetazy delta-1-pirolino-5-karboksylanu w Maresi, Sebastianie, Stratusie i większości genotypów populacji mapującej. Z prowadzonych równolegle badań na poziomie metabolomu na tym samym

materiale roślinnym wynika, że poziom proliny w Cam/B1/CI tylko nieznacznie wzrastał w porównaniu do kontroli, z czym można wiązać brak istotnej zmiany w profilu akumulacji syntetazy delta-1-pirolino-5-karboksylanu w odmianie syryjskiej. Natomiast w Maresi odnotowano ponad 20-krotny wzrost ilości tego związku. Tak duża zmiana stężenia proliny w odmianie niemieckiej wynikała przede wszystkim z jego niskiej zawartości w roślinach kontrolnych, podczas gdy w Cam/B1/CI obserwowano wysoki poziom proliny także w roślinach wzrastających w warunkach optymalnych (Swarcewicz, 2014). Tak duży wzrost stężenia proliny w odmianie Maresi mógł być dla niej toksyczny i powodować zahamowanie aktywności syntetazy delta-1-pirolino-5-karboksylanu na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez prolinę (Hu i in., 1992). W siewkach pszenicy różniących się stopniem tolerancji na deficyt wody, zmierzone stężenie proliny w obu genotypach było takie samo, jednakże odmiana odporna szybciej ją akumulowała i metabolizowała. Wydaje się więc, że kluczowym dla tolerancji na suszę jest właściwa regulacja metabolizmu tego związku, a nie tylko wzrost poziomu jego akumulacji (Nayyar i Walia, 2003).

Efekt suszy dla białek biorących udział w ekspresji genów był przeważnie nieistotny w obrębie genotypów populacji mapującej, o czym świadczy także brak wyraźnego zróżnicowania pomiędzy profilami akumulacji białek w kontroli i suszy (tab. 4.14., ryc. 4.16.).

Czynnik transkrypcyjny z rodziny NAC w części genotypów charakteryzował się negatywnym efektem suszy. Białka należące do tej rodziny biorą udział w wielu procesach związanych z rozwojem roślin, a także stanowią kluczowy składnik odporności zarówno na stresy biotyczne jak i abiotyczne. Czynniki NAC uczestniczą w wielu ścieżkach regulatorowych podczas adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiska. Powodują aktywację wielu genów, także tych zaangażowanych w odpowiedź na stresy abiotyczne (Golldack i in., 2011). Wykazano, że aktywność czynników transkrypcyjnych z rodziny NAC i w efekcie procesy, w których uczestniczą związane np. z nabywaniem tolerancji, mogą być regulowane przez małe RNA (Liu i in., 2008). W roślinach z nadekspresją genu kodującego jeden z czynników transkrypcyjnych NAC obserwowano wzrost odporności na suszę i zasolenie, przejawiający się m.in. lepszym plonem w porównaniu do roślin typu dzikiego. Nadekspresja tego czynnika spowodowała wzmożoną indukcję ekspresji genów kodujących kinazy, inne rodziny czynników transkrypcyjnych, a także cytochrom P450 oraz transporter potasu (Jeong i in., 2010). Z drugiej strony, w innych badaniach, w *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano inny czynnik transkrypcyjny NAC będący negatywnym regulatorem indukcji genów biorących udział w odpowiedzi na suszę. Mutanty, u których zahamowano

ekspresję genu kodującego ten czynnik charakteryzowały się wzmożoną ekspresją genów związanych z tolerancją niedoboru wody (Lu i in., 2006).

Kierunek zmian białek zidentyfikowanych jako izoformy czynnika inicjacji translacji 4A oraz czynnika elongacji translacji Tu (ang. *thermo unstable*) różnicował odmiany rodzicielskie. Wśród genotypów populacji mapującej dominował brak istotnej zmiany profilu akumulacji tych białek, chociaż u części z nich odnotowano dodatni efekt suszy. U odmiany niemieckiej Maresi obserwowano przeważnie spadki względnej ilości izoform czynnika inicjacji translacji 4A oraz czynnika elongacji translacji Tu, podczas gdy u Cam/B1/CI odnotowano brak zmiany lub wzrost akumulacji tych białek.

Eukariotyczny czynnik inicjacji 4A należy do rodziny helikaz RNA, białek odgrywających kluczowe role w podstawowych procesach komórkowych związanych z ekspresją genów. Helikazy RNA mają zdolność do rozplatania dupleksów drugorzędowych struktur RNA (Matson i in., 1994). Susza i inne niekorzystne stresy abiotyczne wpływają na stabilność i strukturę mRNA oraz syntezę białek. Niekorzystne działanie czynników środowiskowych powoduje wzmożenie tworzenia się struktur drugorzędowych w rejonie sekwencji nieulegającej translacji 5'UTR (ang. *5' untranslated region*) mRNA, które obniżają wydajność inicjacji translacji. Czynniki inicjacji translacji 4A i 4B wiążą się do tego regionu i rozplatają uformowane struktury drugorzędowe, co znacznie ułatwia wiązanie się rybosomu i inicjację procesu syntezy łańcucha peptydowego (Vashisht i Tuteja, 2006). W tytoniu, nadekspresja genu kodującego jedną z helikaz DNA *pdh45*, która wykazuje znaczną homologię w stosunku do czynnika inicjacji translacji 4A, spowodowała wzrost tolerancji na zasolenie, a otrzymane transgeniczne potomstwo, które również wzrastało w warunkach zasolenia, charakteryzowało się wysokim plonem. Zwiększona ekspresja helikazy mogła mieć wpływ na zmianę ekspresji genów, ułatwienie translacji poprzez zmianę struktury mRNA i wzmożenie syntezy białka (Sanan-Mishra i in., 2005). Zmiany poziomu różnych helikaz pod wpływem stresów abiotycznych były obserwowane m.in. w jęczmieniu i grochu, gdzie przypuszczalnie pełniły funkcje związane z regulacją genów zaangażowanych w tolerowanie tych stresów (Nakamura i in., 2004; Vashisht i in., 2005).

Czynnik elongacyjny Tu występuje w plastydach i mitochondriach, gdzie odpowiada za wiązanie i transport odpowiednich aminoacylo-tRNA podczas syntezy łańcucha peptydowego (Fu i in., 2012). Wzrost poziomu chloroplastowej izoformy tego białka obserwowano m.in. w linii odpornej kukurydzy poddanej działaniu wysokich temperatur (Bhadula i in., 2001) oraz ryżu wzrastającego w warunkach niedoboru wody (Salekdeh i in., 2002). Wykazano, że bakteryjny czynnik elongacyjny Tu spełnia dodatkową funkcję białka

opiekuńczego, które posiada zdolność ponownego fałdowania zdenaturowanych białek oraz zapobiegania ich agregacji (Caldas i in., 1998). Prokariotyczne i plastydowe czynniki elongacji Tu wykazują bardzo dużą homologię i jest wysoce prawdopodobne, że roślinne czynniki elongacyjne również mogą odgrywać dodatkową rolę i przez to uczestniczyć w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiska (Singh i in., 2004).

Amoniakoliza fenyloalaniny, kluczowy enzym szlaku fenylopropanoidowego, jest łącznikiem pomiędzy metabolizmem pierwotnym i metabolizmem wtórnym roślin. W blisko połowie badanych genotypów enzym ten wykazywał dodatni efekt suszy, a także silną interakcję genotyp $\times$ susza (tab. 4.12.). Reakcja przemiany aminokwasu fenyloalaniny do amoniaku i kwasu trans-cynamonowego katalizowana przez to białko rozpoczyna syntezę różnych klas fenolowych metabolitów wtórnych, m.in. flawonoidów, fenylopropanoidów czy lignin, które biorą udział w wielu procesach, kluczowych dla rozwoju i przetrwania rośliny w środowisku, np. są składnikami ścian komórkowych (ligniny, kwasy fenolowe), biorą udział w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne. Spełniają także rolę barwników oraz uczestniczą w przekazywaniu sygnałów (Treutter, 2006). Amoniakoliza fenyloalaniny jest enzymem silnie zaangażowanym w reakcje roślin na różne stresy środowiskowe (Dixon i Paiva, 1995). Wzrost akumulacji tego enzymu może świadczyć o wzmożonej syntezie związków fenolowych. Przykładowo, zmiana wzoru lignifikacji ścian komórkowych stanowi ważny mechanizm adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiska takich jak niedobór wody czy zasolenie. Wzrost odkładania się lignin w ścianie komórkowej prowadzi do ich usztywnienia. To z kolei powoduje wzmocnienie wytrzymałości komórek, jednakże w konsekwencji prowadzi do zahamowania ich wzrostu (Lee i in., 2007). Wykazano, że zwiększona zawartość innej grupy metabolitów fenolowych – tanin, w roślinach poddanych działaniu suszy zapobiega pękaniu ścian komórkowych i stanowi ważny mechanizm tolerowania niedoboru wody obserwowany w wielu roślinach naturalnie występujących na obszarach suchych (Pizzi i Cameron, 1986). W badaniach nad kukurydzą wzrastającą w warunkach ograniczonej dostępności wody wzrost aktywności amoniakolizy fenyloalaniny korelował z potencjałem przeciwutleniającym rośliny w trakcie suszy, co sugeruje zaangażowanie tego enzymu w mechanizm usuwania wolnych rodników (Gholizadeh, 2011). Produkty szlaku fenylopropanoidowego, jak flawonoidy, antocyjaniny i kwasy fenolowe, w warunkach stresu oksydacyjnego mogą stanowić alternatywny mechanizm fotochemicznego rozpraszania nadmiaru docierającej energii i przez to wpływać na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego komórki (Grace i Logan, 2000).

Odpowiedź roślin na suszę oraz jej tolerowanie jest bardzo złożonym procesem, w który zaangażowanych jest wiele mechanizmów na wszystkich poziomach organizacji molekularnej. Ocena zmian poziomu akumulacji białek w odpowiedzi na stres daje duży pogląd na funkcjonowanie roślin w trakcie wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiska i dostarcza cennych informacji na temat procesów zaangażowanych w neutralizowanie skutków danego stresu.

Analizy skutków suszy i każdego innego stresu abiotycznego na poziomie proteomu stanowią przydatne narzędzie w poszukiwaniu markerów związanych z podwyższoną tolerancją na dany niekorzystny czynnik środowiskowy. Wykorzystanie zidentyfikowanych białek-markerów w hodowli konwencjonalnej pozwoli na wydajniejszą selekcję nowych odmian, a geny kodujące takie białka mogą zostać wykorzystane do tworzenia nowych, genetycznie modyfikowanych odmian, które będą się charakteryzować lepszymi parametrami wzrostowymi w nieoptymalnych warunkach środowiska. Większość ze zidentyfikowanych białek w badaniach opisanych w niniejszej pracy (tab. 4.1-4.4., 4.10., 4.11., 4.12.) należy traktować przede wszystkim jako wskaźniki zaistnienia suszy. Jednakże, białka, które charakteryzowały się silną interakcją genotyp $\times$ susza (tab. 4.15.), jak np. izoforma B aktywazy RuBisCO czy białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego (ryc. 4.9., tab. 4.12.) mogą być związane ze specyficznnością odpowiedzi roślin na niedobór wody.

W przypadku analiz proteomicznych gdzie bada się niewielką liczbę genotypów, ocena liczby oraz kierunku zmian białek biorących udział w poszczególnych procesach biologicznych, może pozwolić na ocenę poziomu tolerancji na suszę. Wytypowanie białek, których zmiana profilu akumulacji w suszy mogłaby być związana z potencjałem genetycznym danej odmiany w takiej analizie jest utrudniona, z tego względu, że różnice w poziomach akumulacji pomiędzy odmianami są obserwowane dla większości białek, które zareagowały na suszę. Ocena interakcji pomiędzy zmianą w profilu białka i genotypem w przypadku małej ilości badanych obiektów, jest z punktu widzenia statystyki niemożliwa. Reakcja na suszę odmiany syryjskiej na poziomie proteomu liścia znacznie różniła się od pozostałych trzech pochodzenia europejskiego (ryc.4.5, tab. 4.5., tab. 4.6.). W odmianie Cam/B1/CI na niedobór wody zareagowała najmniejsza liczba białek, ale zdecydowana większość z nich zwiększyła swój poziom akumulacji w stosunku do roślin kontrolnych, zwłaszcza w kategorii związanej z mechanizmami obronnymi, w przeciwieństwie do pozostałych genotypów, gdzie większość charakteryzowała się ujemnym efektem suszy. Różnice w profilu akumulacji białek pomiędzy odmianami rodzicielskimi były również zauważalne w analizie niecelowanej (ryc. 4.14, tab. 4.17.).

Wykorzystanie odpowiednich metod oceny statystycznej profilu zmian wybranych białek dużej liczby genotypów, pozwala rozróżnić białka, dla których wyłącznie zmiana poziomu akumulacji pomiędzy suszą i kontrolą jest istotna od tych, które dodatkowo różnicują genotypy między sobą i mogą być związane z potencjałem genetycznym danej odmiany. Białka o istotnej interakcji genotyp $\times$ susza mogą stanowić potencjalne markery związane z poziomem tolerancji rośliny na niedobór wody.

Geny kodujące wiele z przedstawionych w niniejszej pracy białek, które charakteryzowały się silną zależnością pomiędzy genotypem i warunkami wzrostu bardzo często były wykorzystywane do tworzenia roślin genetycznie modyfikowanych, u których w wielu przypadkach uzyskano zwiększoną tolerancją na suszę i/lub inne stresy abiotyczne, co tylko potwierdza ich ogromne znaczenie w procesach adaptacyjnych roślin do niekorzystnych warunków środowiska (Vinocur i Altman, 2005). Jednakże, aby wśród zidentyfikowanych białek różnicujących ostatecznie zidentyfikować te, które są związane z odpornością na suszę, konieczne jest skorelowanie uzyskanych wyników z danymi pochodzącymi m.in. z analiz genomu, transkryptomu i metabolomu, a także z parametrami fizjologicznymi, morfologicznymi i anatomicznymi roślin i przede wszystkim właściwościami otrzymanego plonu. Systemowe podejście do problemu odporności na suszę na dużej ilości badanych genotypów pozwoli na uzyskanie pełnego obrazu zachodzących procesów podczas trwania suszy i identyfikację markerów związanych z odpornością na ten stres (Wollenweber i in., 2005).

6. WNIOSKI

1. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym oraz spektrometria mas (MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF) stanowią przydatne techniki służące ocenie profili akumulacji białek oraz ich identyfikacji.
2. W przypadku organizmów, dla których nie są dostępne kompletne sekwencje genowe proces kolizyjnie indukowanej fragmentacji peptydów w porównaniu do techniki peptydowego odcisku palca jest skuteczniejszą metodą identyfikacji białek.
3. Warunki suszy zastosowanej w doświadczeniu umożliwiły obserwację reakcji roślin na poziomie proteomu w każdym z analizowanych genotypów, a otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na fakt, że niedobór wody ma ogromny wpływ na profil akumulacji białek w roślinach.
4. Odmienna reakcja proteomu Cam/B1/CI w porównaniu do trzech odmian europejskich, (Maresi, Sebastian, Stratus) mogła być związana z pochodzeniem geograficznym tej odmiany i jej lepszym przystosowaniem do wzrostu w warunkach niedoboru wody.
5. Ocena profili akumulacji białek dużej liczby genotypów w programie Image Master Platinum 2D jest w znacznym stopniu utrudniona, a interpretacja danych wymaga stosowania dodatkowych programów komputerowych oraz odpowiednich metod statystycznych
6. Reakcja na poziomie proteomu odmian rodzicielskich, referencyjnych oraz linii rekombinacyjnych populacji mapującej jęczmienia wskazuje na konserwatywną odpowiedź tego gatunku na suszę.
7. Większość ze zidentyfikowanych białek różnicujących rośliny kontrolne od wzrastających w warunkach niedoboru wody jest związana wyłącznie z wystąpieniem suszy, a nie ze specyficznością reakcji poszczególnych genotypów.
8. Białka, dla których interakcja genotyp $\times$ susza była istotna statystycznie mogą stanowić potencjalne markery związane z odpornością na niedobór wody. Szczególna uwaga powinna być zwrócona na białka o najsilniejszej interakcji genotyp $\times$ susza i dodatnim efekcie suszy: izoforma B aktywazy RuBisCO, dwie izoformy białka wiążącego światła retikulum endoplazmatycznego oraz białko szoku cieplnego o masie 70 kDa.

9. Profile akumulacji białek, które charakteryzowały się silną interakcją genotyp x susza powinny zostać skorelowane z innymi danymi uzyskanymi w projekcie POLAPGEN-BD w celu oceny ich przydatności do selekcji odmian odpornych na suszę.
10. Obserwowane na dendrogramie (ryc. 4.18.) zróżnicowanie linii populacji mapującej na dwie wyraźne grupy może być związane z częstością występowania alleli po jednym bądź drugim rodzicu.

7. STRESZCZENIE

Rośliny jako organizmy osiadłe są nieustannie narażone na niekorzystne działanie czynników środowiskowych, zarówno biotycznych (infekcja organizmu patogennego) jak i abiotycznych (np. susza, zasolenie, nadmiar/niedobór światła, wysokie/niskie temperatury). Odpowiedź na stresy abiotyczne jest zjawiskiem złożonym w swojej naturze, będącym wynikiem działania wielu genów.

Niedobór wody stanowi jeden z głównych czynników ograniczających wzrost i rozwój roślin, a w przypadku upraw także produktywność. Pomimo wielu intensywnych badań mechanizmy molekularne leżące u podstaw tolerowania stresów abiotycznych przez rośliny są wciąż słabo poznane. Adaptacja roślin do niekorzystnych czynników środowiskowych, takich jak susza wymaga odpowiedzi i przystosowania organizmu na wszystkich poziomach jego organizacji, od molekularnego do morfologicznego. Obserwowane zmiany dotyczą m.in. różnic w ekspresji genów, akumulacji specyficznych białek i metabolitów, dzięki czemu roślina może np. zwiększyć aktywność systemu usuwania nadmiaru wolnych rodników czy dostosować swój potencjał osmotyczny.

Rozwój wydajnych metod rozdziału i identyfikacji białek w dużej spowodował, że proteomika stała się użytecznym narzędziem wykorzystywanym w studiowaniu odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe. Zwłaszcza analizy porównawcze dają duży pogląd na funkcjonowanie roślin w trakcie wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiska i dostarczają cennych informacji na temat procesów zaangażowanych w neutralizowanie skutków danego stresu.

W ramach przedłożonej pracy doktorskiej przeprowadzono analizy profili akumulacji białek liści jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) w odpowiedzi na niedobór wody w podłożu za pomocą elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas. Badania były prowadzone na odmianach rodzicielskich Maresi i Cam/B1/CI, 100 rekombinacyjnych liniach wsobnych pochodzących ze skrzyżowania obu tych genotypów oraz odmianach referencyjnych Sebastian i Stratus.

Warunki suszy, w których prowadzono doświadczenia umożliwiły obserwację zmian zachodzących w proteomie w każdym z analizowanych genotypów, a otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na fakt, że niedobór wody ma ogromny wpływ na profil akumulacji

białek w roślinie. Zidentyfikowane białka, których poziom akumulacji zmienił się pod wpływem suszy były zaangażowane w różnorodne procesy biochemiczne związane z reakcjami obronnymi, fotosyntezą, metabolizmem węgla i azotu, ekspresją genów, transportem jonów i elektronów oraz metabolizmem wtórnym. Wykorzystanie odpowiednich metod oceny statystycznej profilu zmian wybranych białek na dużej liczby genotypów, pozwoliło na rozróżnienie białek, dla których wyłącznie zmiana poziomu akumulacji pomiędzy suszą i kontrolą była istotna od tych, dla których ta zmiana dodatkowo różnicowała genotypy między sobą. Białka dla których zachodziła istotna statystycznie interakcja genotyp $\times$ susza mogą stanowić potencjalne markery związane z poziomem tolerancji suszy przez roślinę.

Przedstawione w niniejszej pracy badania stanowią część projektu badawczego POLAPGEN-BD, którego nadrzędnym celem jest opracowanie narzędzi biotechnologicznych służących do selekcji odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę, realizowanym zgodnie z koncepcją biologii systemów.

8. LITERATURA

- Aarti, D., Tanaka, R., Ito, H., Tanaka, A. (2007). High Light Inhibits Chlorophyll Biosynthesis at the Level of 5-Aminolevulinate Synthesis During De-etiolation in Cucumber (*Cucumis sativus*) Cotyledons†. *Photochem. Photobiol.* 83, 171–176.
- Abebe, T. (2003). Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiol.* 131, 1748–1755.
- Acar, O., Türkan, I., Özdemir, F. (2001). Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiol. Plant.* 23, 351–356.
- Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Ali, G.M., Komatsu, S. (2006). Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J. Proteome Res.* 5, 396–403.
- Alikhani, M., Khatabi, B., Sepehri, M., Nekouei, M.K., Mardi, M., Salekdeh, G.H. (2013). A proteomics approach to study the molecular basis of enhanced salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) conferred by the root mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *Mol. Biosyst.* 9, 1498–1510.
- Alscher, R.G. (1989). Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77, 457–464.
- Alvarez, S., Roy Choudhury, S., 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.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J.C., Nogues, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 62, 111–123.
- 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.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.

- 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, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* 28, 169–183.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Asíns, M.J. (2002). Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breed.* 121, 281–291.
- Badr, A., M, K., Sch, R., Rabey, H.E., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F. (2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17, 499–510.
- Baerenfaller, K., Grossmann, J., Grobei, M.A., Hull, R., Hirsch-Hoffmann, M., Yalovsky, S., Zimmermann, P., Grossniklaus, U., Gruissem, W., Baginsky, S. (2008). Genome-Scale Proteomics Reveals *Arabidopsis thaliana* Gene Models and Proteome Dynamics. *Science* 320, 938–941.
- Bänziger, M., Setimela, P.S., Hodson, D., Vivek, B. (2004). Breeding for improved drought tolerance in maize adapted to southern Africa. *International Crop Science Congress*.
- Beale, E.M., Little, R.J. (1975). Missing values in multivariate analysis. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 129–145.
- Beale, S.I., Castelfranco, P.A. (1974). The Biosynthesis of δ -Aminolevulinic Acid in Higher Plants: I. Accumulation of δ -Aminolevulinic Acid in Greening Plant Tissues. *Plant Physiol.* 53, 291–296.
- Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D., Atlin, G. (2007). A Large-Effect QTL for Grain Yield under Reproductive-Stage Drought Stress in Upland Rice. *Crop Sci* 47, 507–516.
- Berth, M., Moser, F., Kolbe, M., Bernhardt, J. (2007). The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1223–1243.
- Bhadula, S.K., Elthon, T.E., Habben, J.E., Helentjaris, T.G., Jiao, S., Ristic, Z. (2001). Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line. *Planta* 212, 359–366.
- Biron, D.G., Brun, C., Lefevre, T., Lebarbenchon, C., Loxdale, H.D., Chevenet, F., Brizard, J.-P., Thomas, F. (2006). The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. *Proteomics* 6, 5577–5596.
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.-C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M.J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., et al. (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.
- Bolger, M.E., Weisshaar, B., Scholz, U., Stein, N., Usadel, B., Mayer, K.F. (2014). Plant genome sequencing — applications for crop improvement. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 31–37.
- Bolot, S., Abrouk, M., Masood-Quraishi, U., Stein, N., Messing, J., Feuillet, C., Salse, J. (2009). The “inner circle” of the cereal genomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 119–125.

- Bota, J., Medrano, H., Flexas, J. (2004). Is photosynthesis limited by decreased RuBisCO activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* 162, 671–681.
- Bowler, C., Montagu, M.V., Inze, D. (1992). Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Werentilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. W *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, red. (Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists), 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.
- Cai, S.J., Inouye, M. (2002). EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 24155–24161.
- Caldas, T.D., El Yaagoubi, A., Richarme, G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* 273, 11478–11482.
- Caraux, G., Pinloche, S. (2005). PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 21, 1280–1281.
- 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 Sci.* 177, 570–576.
- Cascardo, J.C., Almeida, R.S., Buzeli, R.A., Carolino, S.M., Otoni, W.C., Fontes, E.P. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J. Biol. Chem.* 275, 14494–14500.
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R.J., Anstrom, D.C., Harrison, J., Stoecker, M., Abad, M., Kumar, G., Salvador, S., D'Ordine, R., et al. (2008). Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions. *Plant Physiol.* 147, 446–455.
- Catherman, A.D., Skinner, O.S., Kelleher, N.L. (2014). Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Adv. OMICs-Based Discip.* 445, 683–693.
- Chandra Babu, R., Zhang, J., Blum, A., David Ho, T.-H., Wu, R., Nguyen, H.. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* 166, 855–862.
- Chaves, M.M. (1991). Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- Chaves, M.M., Oliveira, M.M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365–2384.
- Chen, T.H.H., Murata, N. (2011). Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 34, 1–20.
- Chevallet, M., Luche, S., Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* 1, 1852–1858.
- Cho, E., Hong, C. (2006). Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25, 349–358.

- Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (2001). Matching peptide mass spectra to EST and genomic DNA databases. *Trends Biotechnol.* 19, S17–S22.
- Close, T.J., Wanamaker, S.I., Caldo, R.A., Turner, S.M., Ashlock, D.A., Dickerson, J.A., Wing, R.A., Muehlbauer, G.J., Kleinhofs, A., Wise, R.P. (2004). A New Resource for Cereal Genomics: 22K Barley GeneChip Comes of Age. *Plant Physiol.* 134, 960–968.
- Cominelli, E., Conti, L., Tonelli, C., Galbiati, M. (2013). Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnol.* 30, 355–361.
- Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 5, 187–188.
- Cottrell, J.S. (2011). Protein identification using MS/MS data. *J. Proteomics* 74, 1842–1851.
- 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.
- Cramer, R. (2009). MALDI MS. W Proteomics, J. Reinders, A. Sickmann, red. (Humana Press), 85–103.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11, 163.
- 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.
- Cruz de Carvalho, M.H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signal. Behav.* 3, 156–165.
- Danquah, A., Zelicourt, A. de, Colcombet, J., Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* 32, 40–52.
- 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. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 779–795.
- 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.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21–26.
- Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999). H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 50, 1863–1866.
- Desikan, R., Neill, S.J., Hancock, J.T. (2000). Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 773–778.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 127, 159–172.
- Dietz, K.-J. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* 57, 1697–1709.

- Dietz, K.J., Horling, F., König, J., Baier, M. (2002). The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* 53, 1321–1329.
- 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.
- Dóczi, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., Hirt, H. (2007). The *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MKK3 Is Upstream of Group C Mitogen-Activated Protein Kinases and Participates in Pathogen Signaling. *Plant Cell Online* 19, 3266–3279.
- Dornbos, D.L., Mullen, R.E., Shibles, R.E. (1989). Drought Stress Effects During Seed Fill on Soybean Seed Germination and Vigor. *Crop Sci.* 29, 476.
- Dowsey, A.W., Dunn, M.J., Yang, G.-Z. (2003). The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 1567–1596.
- Duvick, J., Fu, A., Muppirala, U., Sabharwal, M., Wilkerson, M.D., Lawrence, C.J., Lushbough, C., Brendel, V. (2008). PlantGDB: a resource for comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D959–D965.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14863–14868.
- Ellis, R.P. (2000). Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *J. Exp. Bot.* 51, 9–17.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates III, J.R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976–989.
- Eravci, M., Fuxius, S., Broedel, O., Weist, S., Eravci, S., Mansmann, U., Schluter, H., Tiemann, J., Baumgartner, A. (2007). Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 7, 513–523.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 185–212.
- Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., Whitehouse, C. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fernie, A.R., Schauer, N. (2009). Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.* 25, 39–48.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., White, F.M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotech* 20, 301–305.
- Field, H.I., Fenyő, D., Beavis, R.C. (2002). RADARS, a bioinformatics solution that automates proteome mass spectral analysis, optimises protein identification, archives data in a relational database. *Proteomics* 2, 36–47.
- Fock, H.P. (2002). Oxygen Exchange in Relation to Carbon Assimilation in Water-stressed Leaves During Photosynthesis. *Ann. Bot.* 89, 851–859.

- Ford, K.L., Cassin, A., Bacic, A. (2011). Quantitative Proteomic Analysis of Wheat Cultivars with Differing Drought Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 2.
- Forsthoeftel, N.R., Cushman, M., Cushman, J.C. (1995). Posttranscriptional and Posttranslational Control of Enolase Expression in the Facultative Crassulacean Acid Metabolism Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* 108, 1185–1195.
- Foyer, C., Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21–25.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell Online* 17, 1866–1875.
- Frenette Charron, J.-B. (2005). Identification, Expression, Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins. *PLANT Physiol.* 139, 2017–2028.
- Fu, J., Momčilović, I., Prasad, P.V.V. (2012). Roles of Protein Synthesis Elongation Factor EF-Tu in Heat Tolerance in Plants. *J. Bot.* 2012, 1–8.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.-S.P., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 39, 863–876.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1988–1993.
- Gama, F., Bréhélin, C., Gelhaye, E., Meyer, Y., Jacquot, J.-P., Rey, P., Rouhier, N. (2008). Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Physiol. Plant.* 133, 599–610.
- Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15898–15903.
- Gąsiorowski, H. (1922-), Brzeziński, W.J. (1997). *Jęczmień: chemia i technologia : [praca zbiorowa]* (Poznań: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne).
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., et al. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21425–21430.
- Gholizadeh, A. (2011). Effects of Drought on the Activity of Phenylalanine Ammonia Lyase in the Leaves and Roots of Maize Inbred. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5, 952–956.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* 16, 433–442.
- GOLD Database; <http://www.genomesonline.org/>.

- Golldack, D., Lüking, I., Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* 30, 1383–1391.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665–3685.
- 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.
- Graciet, E., Lebreton, S., Gontero, B. (2004). Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex. *J. Exp. Bot.* 55, 1245–1254.
- Grimsrud, P.A., den Os, D., Wenger, C.D., Swaney, D.L., Schwartz, D., Sussman, M.R., Ane, J.-M., Coon, J.J. (2010). Large-Scale Phosphoprotein Analysis in *Medicago truncatula* Roots Provides Insight into in Vivo Kinase Activity in Legumes. *PLANT Physiol.* 152, 19–28.
- Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., Chen, J. (2004). Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant Soil* 258, 241–248.
- GUS (2012). Badanie produkcji roślinnej – wynikowy szacunek produkcji głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodnich, <http://stat.gov.pl/>.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotech* 17, 994–999.
- Haake, V. (2002). Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130, 639–648.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S., Hosseini Salekdeh, G. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5, 950–960.
- Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B.B., Wong, J.H., Majidi, I., Salekdeh, G.H. (2007). Proteomics Uncovers a Role for Redox in Drought Tolerance in Wheat. *J. Proteome Res.* 6, 1451–1460.
- Hanson, A.D., Roje, S. (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 119–137.
- 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, A.D., Gage, D.A., Shachar-Hill, Y. (2000). Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends Plant Sci.* 5, 206–213.
- Heazlewood, J.L., Verboom, R.E., Tonti-Filippini, J., Small, I., Millar, A.H. (2007). SUBA: the *Arabidopsis* Subcellular Database. *Nucleic Acids Res.* 35, D213–D218.

- 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, 63.
- Hirano, H., Islam, N., Kawasaki, H. (2004). Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry* 65, 1487–1498.
- Hirayama, T., Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61, 1041–1052.
- Hjernø, K. (2007). Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting. W Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics, R. Matthiesen, ed. (Humana Press), 61–75.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 45, 131–135.
- 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, 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.
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *PLANT Physiol.* 81, 802–806.
- Hussain, S.S. (2006). Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. *Proc Pak. Acad Sci* 43, 189–210.
- Hwang, I., Chen, H.-C., Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 500–515.
- ICARDA News Drought-tolerant barley, going worldwide, <http://icardanews.wordpress.com/>.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24, 655–665.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7, 301–308.
- Ireland, H.E., Harding, S.J., Bonwick, G.A., Jones, M., Smith, C.J., Williams, J.H.H. (2004). Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers* 9, 139–155.

- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional Analysis of Rice DREB1/CBF-type Transcription Factors Involved in Cold-responsive Gene Expression in Transgenic Rice. *Plant Cell Physiol.* 47, 141–153.
- Jakob, S.S., Rodder, D., Engler, J.O., Shaaf, S., Ozkan, H., Blattner, F.R., Kilian, B. (2014). Evolutionary History of Wild Barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) Analyzed Using Multilocus Sequence Data and Paleodistribution Modeling. *Genome Biol. Evol.* 6, 685–702.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., et al. (2009). MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20520–20525.
- Jeong, J.S., Kim, Y.S., Baek, K.H., Jung, H., Ha, S.-H., Do Choi, Y., Kim, M., Reuzeau, C., Kim, J.-K. (2010). Root-Specific Expression of OsNAC10 Improves Drought Tolerance and Grain Yield in Rice under Field Drought Conditions. *Plant Physiol.* 153, 185–197.
- Jia, W., Davies, W.J. (2007). Modification of Leaf Apoplastic pH in Relation to Stomatal Sensitivity to Root-Sourced Abscissic Acid Signals. *Plant Physiol.* 143, 68–77.
- Jonak, C. (2002). Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 415–424.
- Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Biotechnol.* 26, 147–163.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y., Guy, C.L. (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 4159–4168.
- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotech* 17, 287–291.
- Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A., Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids* 44, 345–359.
- Kavi Kishor, P., Zonglie, H., Miao, G.-H., Hu, C.-A., Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108, 1387–1394.
- 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., et al. (2014). Ensembl Genomes 2013: scaling up access to genome-wide data. *Nucleic Acids Res.* 42, D546–D552.
- Key, M. (2012). A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics* 13, S10.
- Khajeh-Hosseini, M., Powell, A.A., Bingham, I.J. (2003). The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soyabean seread. *Seed Sci. Technol.* 31, 715–725.
- Kidd, B.N., Cahill, D.M., Manners, J.M., Schenk, P.M., Kazan, K. (2011). Diverse roles of the Mediator complex in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 741–748.

- Knight, H., Knight, M.R. (2006). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6, 262–267.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T., Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Plant Proteomics Eur.* 74, 1301–1322.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2940–2945.
- Krapp, A.R., Tognetti, V.B., Carrillo, N., Acevedo, A. (1997). The Role of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase in the Concerted Cell Defense Against Oxidative Damage. *Eur. J. Biochem.* 249, 556–563.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. (2002). Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, Cold Stress. *Plant Physiol.* 130, 2129–2141.
- Krutchinsky, A.N., Kalkum, M., Chait, B.T. (2001). Automatic Identification of Proteins with a MALDI-Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 73, 5066–5077.
- Kuczynska, A., Wyka, T. (2011). The effect of the *denso* dwarfing gene on morpho-anatomical characters in barley recombinant inbred lines. *Breed. Sci.* 61, 275–280.
- Kwak, J.M. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 2623–2633.
- Large, E.C. (1954). Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant Pathol.* 3, 128–129.
- Lata, C., Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 4731–4748.
- Law, R.D., Crafts-Brandner, S.J. (2001). High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 261–267.
- Lawlor, D.W. (2002). Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. *Ann. Bot.* 89, 871–885.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25, 275–294.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P. (2011). Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 18, 17–29.
- 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.
- 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.

- Levesque-Tremblay, G., Havaux, M., Ouellet, F. (2009). The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *Plant J.* 60, 691–702.
- Liu, D., Liu, Y., Rao, J., Wang, G., Li, H., Ge, F., Chen, C. (2013). Overexpression of the glutathione S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants. *Mol. Biol.* 47, 515–523.
- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., Zheng, C.-C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA N. Y.* N 14, 836–843.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 10, 1391–1406.
- Llorens, L., Peñuelas, J., Estiarte, M. (2003). Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and warmer conditions. *Physiol. Plant.* 119, 231–243.
- 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.
- Lu, C., Zhang, J. (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.* 50, 1199–1206.
- Lu, P.-L., Chen, N.-Z., An, R., Su, Z., Qi, B.-S., Ren, F., Chen, J., Wang, X.-C. (2006). A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 63, 289–305.
- 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.
- Luo, S., Ishida, H., Makino, A., Mae, T. (2002). Fe²⁺-catalyzed Site-specific Cleavage of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Close to the Active Site. *J. Biol. Chem.* 277, 12382–12387.
- Lüttge, U. (1993). The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytol.* 125, 59–71.
- Ma, B., Johnson, R. (2012). De Novo Sequencing and Homology Searching. *Mol. Cell. Proteomics* 11, O111.014902–O111.014902.
- Ma, Y., Hendershot, L.M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J. Chem. Neuroanat.* 28, 51–65.
- Majeau, N., Coleman, J.R. (1996). Effect of CO₂ Concentration on Carbonic Anhydrase and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Expression in Pea. *Plant Physiol.* 112, 569–574.
- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. (2009). Performance evaluation of a high-field orbitrap mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 1391–1396.

- 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.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141.
- Marouga, R., David, S., Hawkins, E. (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 669–678.
- Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., Tyagi, A.K. (2011). The Mediator Complex in Plants: Structure, Phylogeny, Expression Profiling of Representative Genes in a Dicot (*Arabidopsis*) and a Monocot (Rice) during Reproduction and Abiotic Stress. *Plant Physiol.* 157, 1609–1627.
- Matson, S.W., Bean, D.W., George, J.W. (1994). DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 16, 13–22.
- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K., Fukami, Y., Kikkawa, U., Yasuda, T. (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J.* 29, 637–647.
- Matthiesen, R., Mutenda, K. (2007). Introduction to proteomics. W Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics, R. Matthiesen, ed. (Humana Press), 1–4.
- Mayer, K.F.X., Martis, M., Hedley, P.E., Šimková, H., Liu, H., Morris, J.A., Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., et al. (2011). Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *Plant Cell Online* 23, 1249–1263.
- Mayer, K.F.X., Waugh, R., Langridge, P., Close, T.J., Wise, R.P., Graner, A., Matsumoto, T., Sato, K., Schulman, A., Muehlbauer, G.J., et al. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*.
- McCue, K.F., Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8, 358–362.
- Meinhard, M., Rodriguez, P., Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* 214, 775–782.
- Meunier, B., Dumas, E., Picc, I., Béchet, D., Hébraud, M., Hocquette, J.-F. (2007). Assessment of Hierarchical Clustering Methodologies for Proteomic Data Mining. *J. Proteome Res.* 6, 358–366.
- Meyer, S., Genty, B. (1999). Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. *Planta* 210, 126–131.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11, 15–19.
- Møller, I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.

- Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Benfey, P.N. (2010). Omics meet networks—using systems approaches to infer regulatory networks in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 126–131.
- Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., DiMario, R.J., Yang, J., Mukherjee, B. (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, physiological roles. *Photosynth. Res.* 109, 133–149.
- Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Zárský, V., Hirt, H. (2006). A Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Mediates Reactive Oxygen Species Homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281, 38697–38704.
- Nakamura, T., Muramoto, Y., Yokota, S., Ueda, A., Takabe, T. (2004). Structural and transcriptional characterization of a salt-responsive gene encoding putative ATP-dependent RNA helicase in barley. *Plant Sci.* 167, 63–70.
- 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 J.* 12, 851–861.
- Nakashima, K., Shinwari, Z., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* 42, 657–665.
- 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., 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.
- Nawrot, R., Barylski, J., Schulze, W.X. (2013). Incorrectly annotated keratin derived peptide sequences lead to misleading MS/MS data interpretation. *J. Proteomics* 91, 270–273.
- Nayyar, H., Walia, D.P. (2003). Water Stress Induced Proline Accumulation in Contrasting Wheat Genotypes as Affected by Calcium and Absciscic Acid. *Biol. Plant.* 46, 275–279.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388–395.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427–448.
- Neverova, I., Eyk, J.E.V. (2005). Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J. Chromatogr. B* 815, 51–63.
- Nevo, E., Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant Cell Environ.* 33, 670–685.
- Ning, J., Li, X., Hicks, L.M., Xiong, L. (2010). A Raf-Like MAPKKK Gene DSM1 Mediates Drought Resistance through Reactive Oxygen Species Scavenging in Rice. *Plant Physiol.* 152, 876–890.

- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.-Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., et al. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 61, 290–299.
- Nixon, P.J. (2004). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J. Exp. Bot.* 56, 357–363.
- Noctor, G., Veljoc-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H. (2002). Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: a Predominant Role for Photorespiration? *Ann. Bot.* 89, 841–850.
- Nowicka, B. (2005). Nizówki i susze. W *Geografia Fizyczna Polski*, A. Richling, K. Ostaszewska, red. (Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN), p. 157.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Ong, S.-E. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386.
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., Marcote, M.J. (2007). Diverse stress signals activate the subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581, 1834–1840.
- Ozturk, Z.N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C., Galbraith, D., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., Bohnert, H. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48, 551–573.
- Pappin, D.J.C., Hojrup, P., Bleasby, A.J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 327–332.
- Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H.R., Lynn, A.M., Singla-Pareek, S.L. (2006). Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142, 380–397.
- Park, S.-Y., Noh, K.-J., Yoo, J.-H., Yu, J.-W., Lee, B.-W., Kim, J.-G., Seo, H., 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.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. -f. F., et al. (2009). Absciscic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324, 1068–1071.
- Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J. (2002). RuBisCO Activity: Effects of Drought Stress. *Ann. Bot.* 89, 833–839.
- Pastori, G.M., Foyer, C.H. (2002). Common Components, Networks, Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of “Redox” and Absciscic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* 129, 460–468.
- Patel, V.J., Thalassinou, K., Slade, S.E., Connolly, J.B., Crombie, A., Murrell, J.C., Scrivens, J.H. (2009). A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches. *J. Proteome Res.* 8, 3752–3759.
- Pei, Z. (1998). Role of Farnesyltransferase in ABA Regulation of Guard Cell Anion Channels and Plant Water Loss. *Science* 282, 287–290.

- Peng, Z., Wang, M., Li, F., Lv, H., Li, C., Xia, G. (2009). A Proteomic Study of the Response to Salinity and Drought Stress in an Introgression Strain of Bread Wheat. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 2676–2686.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., et al. (2000). *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* 103, 1111–1120.
- Phanstiel, D., Unwin, R., McAlister, G.C., Coon, J.J. (2009). Peptide Quantification Using 8-Plex Isobaric Tags and Electron Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 1693–1698.
- Pizzi, A., Cameron, F.A. (1986). Flavonoid tannins — structural wood components for drought-resistance mechanisms of plants. *Wood Sci. Technol.* 20, 119–124.
- Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M.-B., Barre, A., Le Provost, G., Dumazet, H., Jacob, D., et al. (2006). Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 6, 6509–6527.
- Popova, L.P., Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G. (1996). Drought- and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. *Physiol. Plant.* 96, 623–629.
- Porubleva, L., Chitnis, P.R. (2000). Proteomics: a powerful tool in the post-genomic era. *Indian J. Biochem. Biophys.* 37, 360–368.
- Posas, F., Wurglermurphy, S., Maeda, T., Witten, E., Thai, T., Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86, 865–875.
- Potokina, E., Druka, A., Luo, Z., Wise, R., Waugh, R., Kearsey, M. (2008). Gene expression quantitative trait locus analysis of 16,000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *Plant J.* 53, 90–101.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T., Maglott, D.R. (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, D61–D65.
- 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.
- Rabilloud, T., Vaezzadeh, A.R., Potier, N., Lelong, C., Leize-Wagner, E., Chevallet, M. (2009). Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 816–843.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics* 73, 2064–2077.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ.* 29, 2143–2152.

- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE* 8, e66428.
- 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.
- Reguera, M., Peleg, Z., Blumwald, E. (2012). Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Plant Gene Regul. Response Abiotic Stress* 1819, 186–194.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H., et al. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427, 858–861.
- Reynolds, M., Tuberosa, R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 171–179.
- Rhoads, D.M., Subbaiah, C.C. (2007). Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7, 177–194.
- Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D., Zivy, M. (1998). Protein Changes in Response to Progressive Water Deficit in Maize: Quantitative Variation and Polypeptide Identification. *Plant Physiol.* 117, 1253–1263.
- Riccardi, F., Gazeau, P., Jacquemot, M.-P., Vincent, D., Zivy, M. (2004). Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Proteomics* 42, 1003–1011.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotech* 17, 1030–1032.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002a). The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 130, 1143–1151.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J.E., Rodermel, S., Inzé, D., Mittler, R. (2002b). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 32, 329–342.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of *Arabidopsis* to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiol.* 134, 1683–1696.
- Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., Stobiecki, M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1–19.
- Roepstorff, P., Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601.
- Rokka, A., Zhang, L., Aro, E.-M. (2001). RuBisCO activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function?: Temperature-dependent function of RuBisCO activase. *Plant J.* 25, 463–471.

- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J., von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 64, 3201–3212.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M.E., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K.-J., Delledonne, M. (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19, 4120–4130.
- De Ronde, J.A., Cress, W.A., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., Van Staden, J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *J. Plant Physiol.* 161, 1211–1224.
- Rosano, G.L., Bruch, E.M., Ceccarelli, E.A. (2011). Insights into the CLP/HSP100 Chaperone System from Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 286, 29671–29680.
- Roxas, V.P. (2000). Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Seedlings that Overexpress Glutathione S-Transferase/Glutathione Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229–1234.
- Rundle, S.J., Zielinski, R.E. (1991). Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley. *J. Biol. Chem.* 266, 4677–4685.
- Sadygov, R.G., Cociorva, D., Yates, J.R. (2004). Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. *Nat Meth* 1, 195–202.
- Safavi, H., Correa, N., Xiong, W., Roy, A., Adali, T., Korostyshevskiy, V.R., Whisnant, C.C., Seillier-Moiseiwitsch, F. (2008). Independent component analysis of 2-D electrophoresis gels. *Electrophoresis* 29, 4017–4026.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *Plant Cell Online* 18, 1292–1309.
- 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.
- Salvucci, M.E., van de Loo, F.J., Stecher, D. (2003). Two isoforms of RuBisCO activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing. *Planta* 216, 736–744.
- 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.
- 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, 289–295.
- Sarma, A.D., Oehrle, N.W., Emerich, D.W. (2008). Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 379, 192–195.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., et al. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem. J.* 424, 439–448.

- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (2001). Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell Online* 13, 61–72.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., et al. (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.
- Serraj, R., Sinclair, T.R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333–341.
- Shen, Y.-G., Du, B.-X., Zhang, W.-K., Zhang, J.-S., Chen, S.-Y. (2002). AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 105, 815–821.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shikanai, T., Takeda, T., Yamauchi, H., Sano, S., Tomizawa, K.-I., Yokota, A., Shigeoka, S. (1998). Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett.* 428, 47–51.
- Sikorska, K., Rodziewicz, P. (2011). Apekty metodyczne badań proteomów roślinnych. W Na pograniczu Chemii i Biologii, Barciszewski, J., Koroniak H., red. (Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza), 163–192.
- Simpson, S.D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33, 259–270.
- Singh, G., Kumar, R. (2012). Genome-wide Insilico analysis of plant two component signaling system in woody model plant *Populus trichocarpa*. *Res. Plant Biol.* 2, 13–23.
- Singh, B., Mishra, R., Agarwal, P.K., Goswami, M., Nair, S., Sopory, S., Reddy, M. (2004). A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 523–530.
- 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.
- Sirichandra, C., Wasilewska, A., Vlad, F., Valon, C., Leung, J. (2009). The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *J. Exp. Bot.* 60, 1439–1463.
- 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 Sci.* 155, 1–9.

- Smith, L.M., Kelleher, N.L., Linial, M., Goodlett, D., Langridge-Smith, P., Ah Goo, Y., Safford, G., Bonilla*, L., Kruppa, G., Zubarev, R., et al. (2013). Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods* 10, 186–187.
- Socias, X., Correia, M.J., Chaves, M., Medrano, H. (1997). The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *J. Exp. Bot.* 48, 1281–1288.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A. (2004). Lipxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiol. Plant.* 121, 58–65.
- Stapels, M.D., Barofsky, D.F. (2004). Complementary Use of MALDI and ESI for the HPLC-MS/MS Analysis of DNA-Binding Proteins. *Anal. Chem.* 76, 5423–5430.
- Stasyk, T., Huber, L.A. (2004). Zooming in: Fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 4, 3704–3716.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R., Perovic, D., Grosse, I., et al. (2007). A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* 114, 823–839.
- Steinberg, T.H., Haugland, R.P., Singer, V.L. (1996). Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains. *Anal. Biochem.* 239, 238–245.
- 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* 13, 1973–1992.
- Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P.D.B., van Wijk, K.J. (2009). PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Res.* 37, D969–D974.
- Swanson, S.K., Washburn, M.P. (2005). The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discov. Today* 10, 719–725.
- Swarcewicz, B. (2014). Ocena zmian profili metabolitów jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) w warunkach niedoboru wody.
- 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.
- Takeda, T., Yokota, A., Shigeoka, S. (1995). Resistance of Photosynthesis to Hydrogen Peroxide in Algae. *Plant Cell Physiol.* 36, 1089–1095.
- Talame, V., Ozturk, N.Z., Bohnert, H.J., Tuberosa, R. (2006). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J. Exp. Bot.* 58, 229–240.
- Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1987). Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. W Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry, 185–188.
- Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyris, I., Charrier, A., This, D. (1997). Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytol.* 137, 99–107.

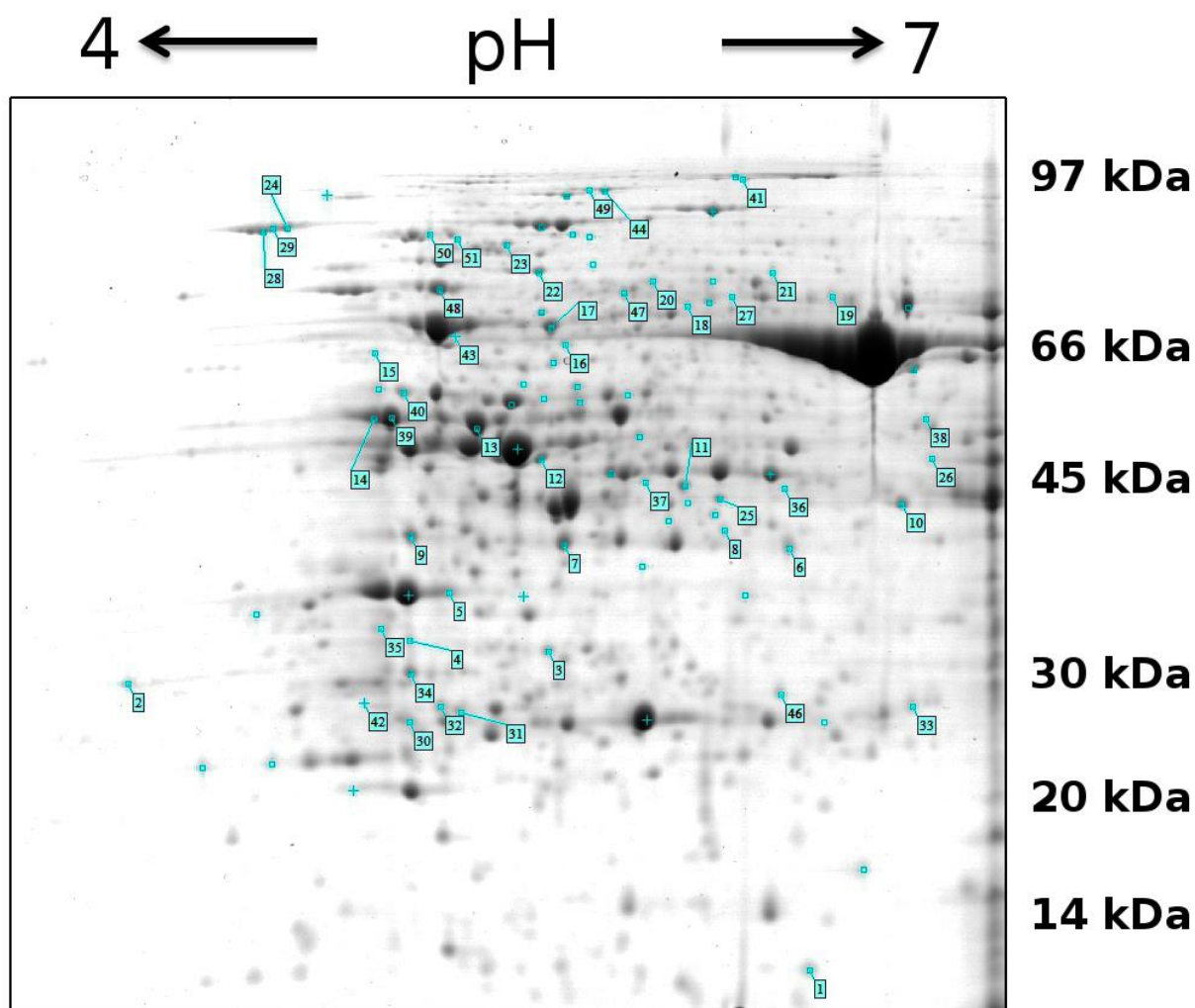
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401, 914–917.
- Thelen, J.J. (2007). Introduction to proteomics: A brief historical perspective on contemporary approaches. W Plant Proteomics, Šamaj, J., Thelen, J., T., red. (Springer), 1–13.
- Thiel, T., Graner, A., Waugh, R., Grosse, I., Close, T., Stein, N. (2009). Evidence and evolutionary analysis of ancient whole-genome duplication in barley predating the divergence from rice. *BMC Evol. Biol.* 9, 209.
- Thornalley, P.J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* 27, 565–573.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397–403.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and Functional Analysis of *Arabidopsis* Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *Plant Cell Online* 16, 2481–2498.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20623–20628.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157.
- Troughton, J., Card, K.A. (1975). Temperature effects on the carbon-isotope ratio of C3, C4 and crassulacean-acid-metabolism (CAM) plants. *Planta* 123, 185–190.
- Tuberosa, R., Salvi, S. (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci.* 11, 405–412.
- Ueda, A., Kathiresan, A., Inada, M., Narita, Y., Nakamura, T., Shi, W., Takabe, T., Bennett, J. (2004). Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *J. Exp. Bot.* 55, 2213–2218.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11632–11637.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K. (2010). “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 132–138.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K. (1999). A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in *Arabidopsis* Functions as an Osmosensor. *Plant Cell Online* 11, 1743–1754.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001). Plant Histidine Kinases: An Emerging Picture of Two-Component Signal Transduction in Hormone and Environmental Responses. *Sci. Signal.* 2001, re18–re18.

- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487–491.
- 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., et al. (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.
- Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., van de Cotte, B., Morsa, S., Ravanat, J.-L., Hegie, A., Triantaphylidès, C., Shulaev, V., Van Montagu, M.C.E., et al. (2011). Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1711–1716.
- 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.
- De Vienne, D., Bost, B., Fiévet, J., Zivy, M., Dillmann, C. (2001). Genetic variability of proteome expression and metabolic control. *Plant Genomics* 39, 271–283.
- Villareal, R., Mujeeb-Kazi, A., Rajaram, S., Del Toro, E. (1994). Morphological variability in some synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum turgidum* x *T. tauschii*. *J. Genet. Breed.* 48, 7–7.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123–132.
- Wang, F.-Z., Wang, Q.-B., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S., Su, W.-A. (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J. Plant Physiol.* 162, 465–472.
- Wang, G.P., Li, F., Zhang, J., Zhao, M.R., Hui, Z., Wang, W. (2010). Overaccumulation 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. (2000). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. IV International Symposium on *W Vitro Culture and Horticultural Breeding* 560, 285–292.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14.
- 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.
- Wang, X., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Cao, W. (2011). Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. *J. Plant Physiol.* 168, 585–593.
- Wang, Z.-Q., Yuan, Y.-Z., Ou, J.-Q., Lin, Q.-H., Zhang, C.-F. (2007). Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164, 695–701.

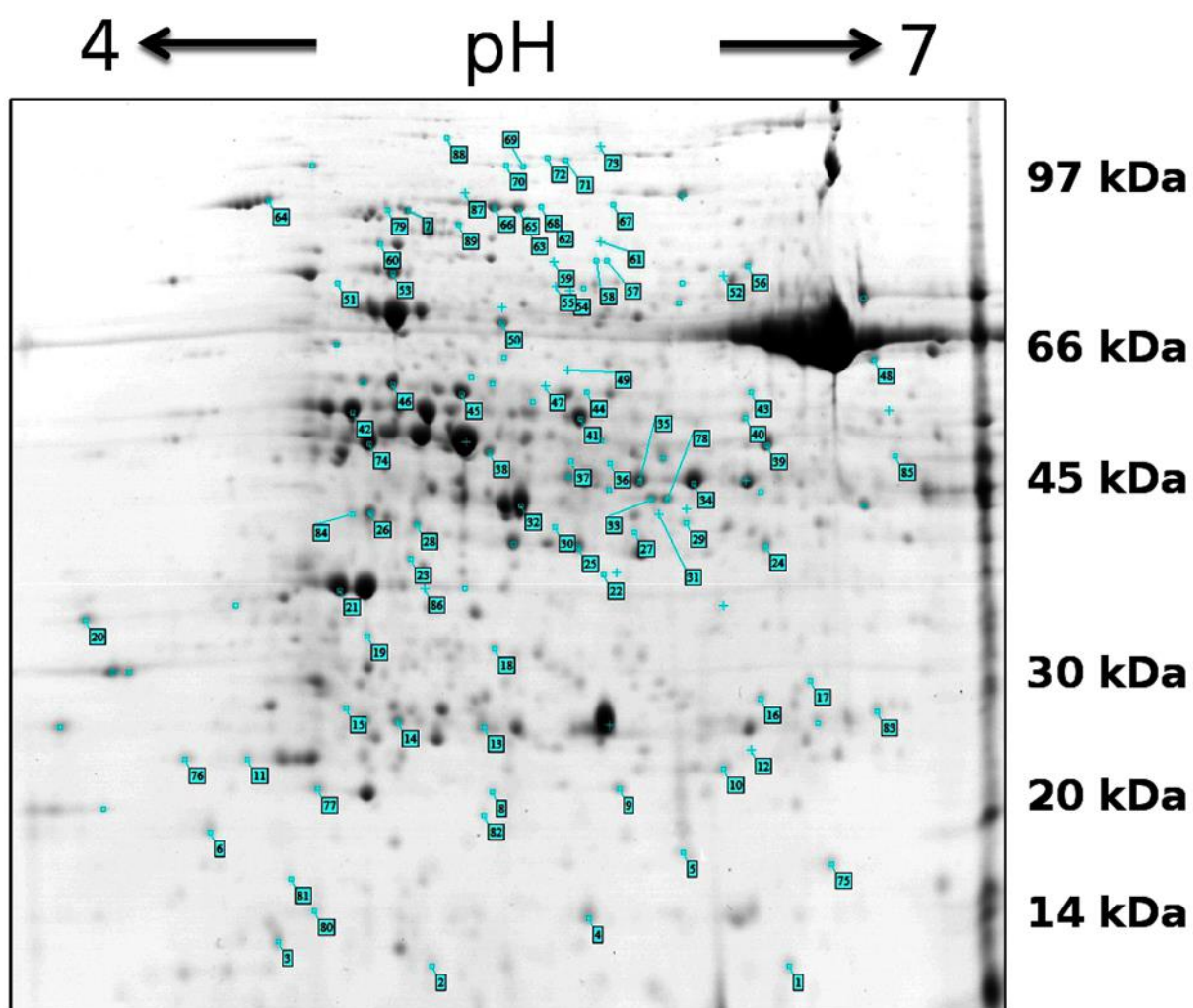
- Wendelboe-Nelson, C., Morris, P.C. (2012). Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties. *Proteomics* 12, 3374–3385.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., et al. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat Biotech* 14, 61–65.
- Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G.-K., Börner, 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.
- Wollenweber, B., Porter, J.R., Lübberstedt, T. (2005). Need for multidisciplinary research towards a second green revolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 337–341.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N., Xiong, L. (2007). Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 115, 35–46.
- Xing, Y., Jia, W., Zhang, J. (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 54, 440–451.
- Xu, C., Huang, B. (2010). Comparative Analysis of Drought Responsive Proteins in Kentucky Bluegrass Cultivars Contrasting in Drought Tolerance. *Crop Sci.* 50, 2543.
- Xu, Z.Z., Zhou, G.S. (2006). Nitrogen Metabolism and Photosynthesis in *Leymus chinensis* in Response to Long-term Soil Drought. *J. Plant Growth Regul.* 25, 252–266.
- Xu, G., Li, C., Yao, Y. (2009). Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins in *Hippophae rhamnoides* L. *Plant Mol. Biol. Report.* 27, 153–161.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K. (2005a). Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 61–67.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K., Sopory, S.K. (2005b). Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Lett.* 579, 6265–6271.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. (1994). A Novel cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* 6, 251–264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10, 88–94.
- 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. (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 297–316.
- Yergey, A.L., Coorssen, J.R., Jr, P.S.B., Blank, P.S., Humphrey, G.A., Zimmerberg, J., Campbell, J.M., Vestal, M.L. (2002). De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 784–791.

- Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol.* *134*, 1654–1661.
- Yoshioka, M., Uchida, S., Mori, H., Komayama, K., Ohira, S., Morita, N., Nakanishi, T., Yamamoto, Y. (2006). Quality Control of Photosystem II: Cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *J. Biol. Chem.* *281*, 21660–21669.
- Zhang, N., Portis, A.R. (1999). Mechanism of light regulation of RuBisCO: a specific role for the larger RuBisCO activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9438–9443.
- Zhang, W., Chait, B.T. (2000). ProFound: An Expert System for Protein Identification Using Mass Spectrometric Peptide Mapping Information. *Anal. Chem.* *72*, 2482–2489.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., Ma, B. (2012). PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics* *11*, M111.010587–M111.010587.
- Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y.-L., Wu, R. (1998). Overexpression of a $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.* *139*, 41–48.
- Zhu, S.-Y., Yu, X.-C., Wang, X.-J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.-C., Shang, Y., Du, S.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., et al. (2007). Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Absciscic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* *19*, 3019–3036.
- Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.-M. (2010). Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 1–6.

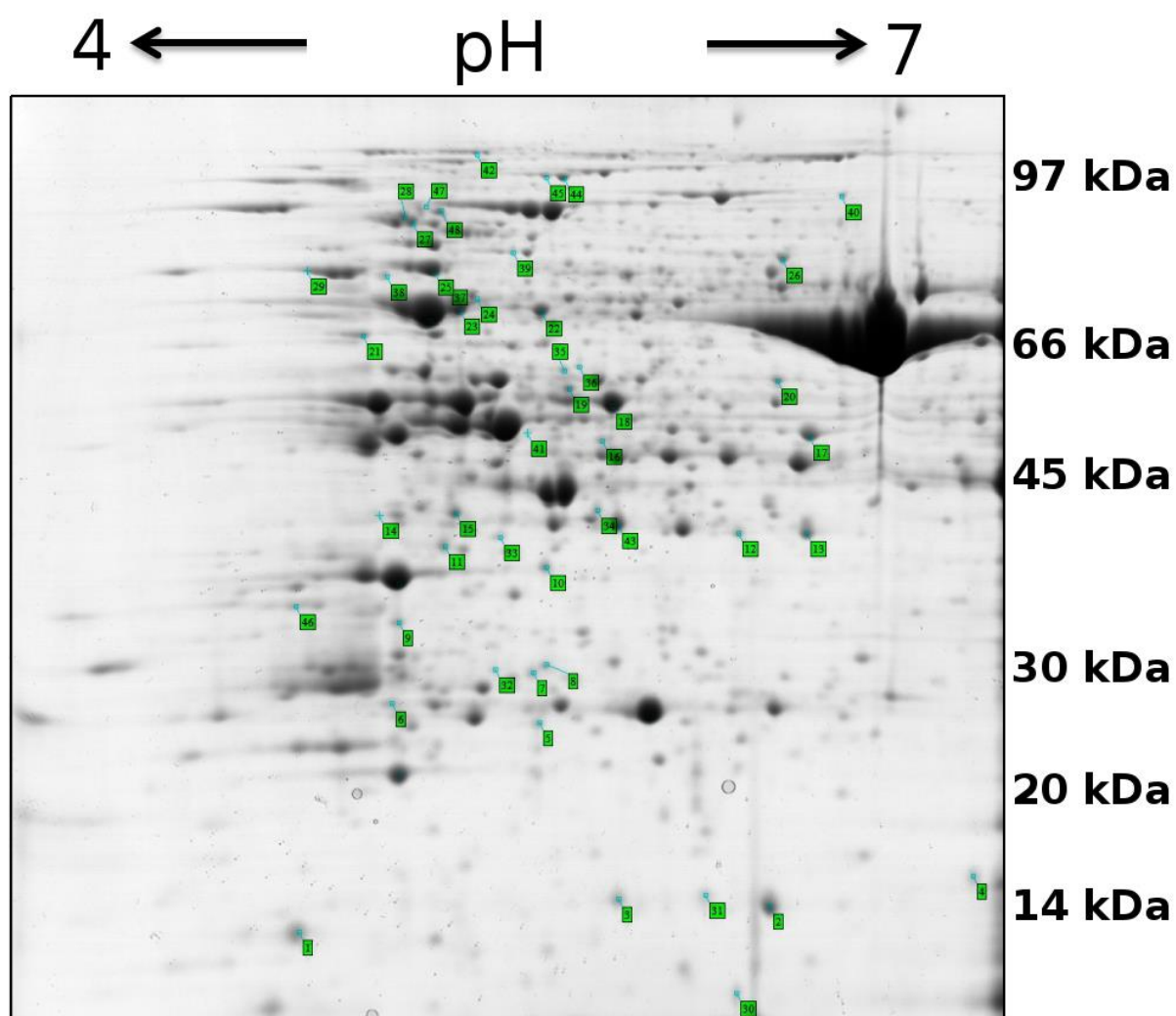
9. SUPLEMENT



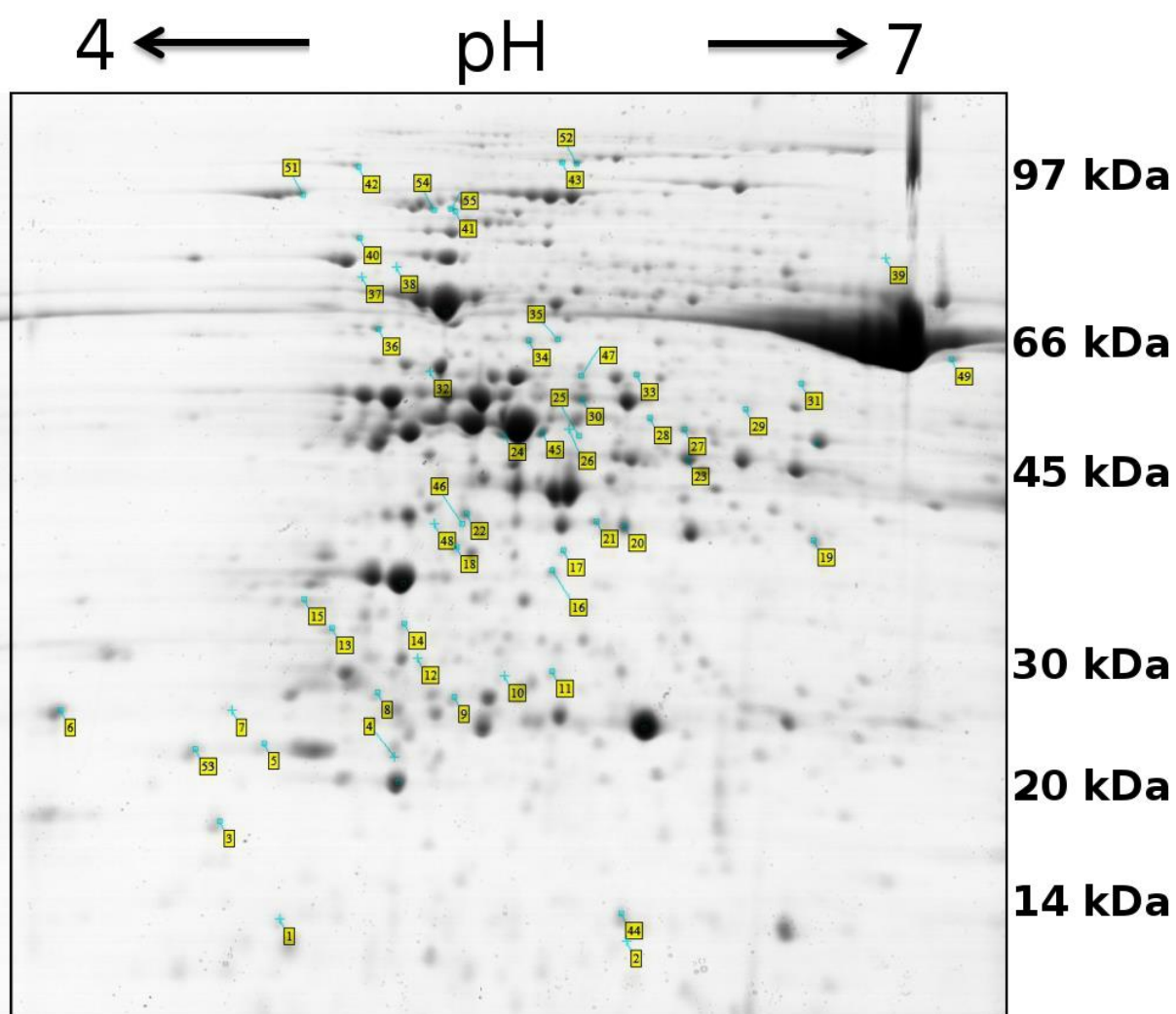
Ryc. S1. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w linii hodowlanej Cam/B1/CI.



Ryc. S2. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Maresi.



Ryc. S3. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Sebastian.



Ryc. S4. Elektroforegram z zaznaczonymi białkami, których poziom akumulacji uległ zmianie pod wpływem suszy w odmianie Stratus.

Tab. S1. Białka, dla których obserwowano wzrost poziomu akumulacji w liniach hodowlanych populacji mapującej MCam. Tabela w większej rozdzielczości została umieszczona na płycie CD.

Zmiana profilu akumulacji (WZROST)	Procent białek	Nazwa białka	Funkcja biologiczna	Przykład genotypu, w którym wystąpiła zmiana w profilu akumulacji białka	Organizm	Metoda identyfikacji	Punktaż z MASCOT (ps0,05)	Procent pokrycia sekwencji	pl (teoretyczny)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Liczba dopasowanych peptydów
10-15	3%	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	Mcam112	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	178	12	8,6	47426	RCAB_HORVU	4/73
		Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne	Mcam001	<i>Solanum lycopersicum</i>	MS/MS	90	4	5,0	73475	BIP_SOLLIC	2/101
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam112	<i>Zea mays</i>	MS/MS	144	5	5,1	70871	HSP70_MAIZE	3/70
		Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	Mcam056	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	162	10	8,6	47426	RCAB_HORVU	4/63
5-10	5%	Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne	Mcam125	<i>Solanum lycopersicum</i>	MS/MS	35	1	5,0	73475	BIP_SOLLIC	1/78
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam112	<i>Zea mays</i>	MS/MS	144	5	5,1	70871	HSP70_MAIZE	3/70
		Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa	Mechanizmy obronne	Mcam118	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	99	19	5,7	106254	LOX21_HORVU	13/56
		Białko wiążące światła ER 2	Mechanizmy obronne	Mcam099	<i>Zea mays</i>	PMF	82	26	5,0	73211	BIP2_MAIZE	12/68
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam029	<i>Zea mays</i>	MS/MS	100	3	5,0	71581	HSP70_MAIZE	2/93
		Helikaza RNA 9 zależna od ATP	Ekspresja genów	Mcam048	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	27	1	10,1	65782	RH9_ORYSJ	1/97
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	PMF	64	26	6,2	53672	RBL_HORVU	12/80		
		RuBisCO, mała podjednostka	Fotosynteza	Mcam060	<i>Lemna gibba</i>	PMF	53	35	9,2	20074	RBS3_LEMGI	3/6
		Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	Mcam056	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	208	7	8,9	51383	RCAA_HORVU	2/61
		Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	Mcam084	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	244	14	8,7	45909	RCAB_HORVU	4/67
		Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	Mcam069	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	64	34	9,7	24635	UCR1A_ARATH	6/70
		Białko wiążące chlorofil	Fotosynteza	Mcam129	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	126	8	5,8	26732	CB121_HORVU	2/82
		Peroksyreduktyna dwucysteinowa	Mechanizmy obronne	Mcam129	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	278	24	5,4	23398	BAS1_HORVU	4/71
		Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	Mcam096	<i>Capsicum annuum</i>	MS/MS	79	2	6,6	71245	FTSH_CAPAN	1/86
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam112	<i>Zea mays</i>	MS/MS	68	3	5,0	71581	HSP70_MAIZE	2/118
		Lipooksygenaza 1	Mechanizmy obronne	Mcam110	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	30	2	5,7	96447	LOX1_HORVU	1/60
3-5	24%	Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa	Mechanizmy obronne	Mcam108	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	110	27	5,7	106254	LOX21_HORVU	21/81
		Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne	Mcam035	<i>Solanum lycopersicum</i>	MS/MS	37	1	5,0	73475	BIP_SOLLIC	1/68
		Białko wiążące światła ER 2	Mechanizmy obronne	Mcam026	<i>Zea mays</i>	PMF	82	26	5,0	73211	BIP2_MAIZE	12/68
		Manganianowa dysmutaza ponadlienkowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	Mcam129	<i>Zea mays</i>	MS/MS	119	11	7,8	25529	SODM1_MAIZE	2/48
		C-kołcowa hydrolaza ubikwityny	Mechanizmy obronne	Mcam006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	36	5	4,8	77097	UBP19_ARATH	2/91
		Syntaza metioniny	Metabolizm azotu	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	53	4	5,6	84794	QGBCT3_HORVU	2/91
		Aspartokinaza 2	Metabolizm azotu	Mcam039	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	58	26	6,3	60137	AK2_ARATH	11/98
		Reduktoizomeraza ketolokwasowa	Metabolizm azotu	Mcam039	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	87	2	6,0	62680	ILV5_ORYSJ	1/76
		Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm azotu	Mcam039	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	132	4	5,6	98591	ACOC_ORYSJ	3/81
		Dehydrogenaza alkoholowa 2	Metabolizm węgla	Mcam056	<i>Solanum tuberosum</i>	PMF	54	25	5,9	41802	ADH2_SOLTU	11/105
		Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	Mcam069	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	48	2	6,5	42208	ALFC_ORYSJ	1/48
		Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	Mcam045	<i>Medicago sativa</i>	MS/MS	33	5	7,8	39458	PMFDH_MEDSA	1/48
		Glioksylaza I	Metabolizm węgla	Mcam048	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	67	3	7,7	39427	LGUC_ARATH	1/33
		Kinaza bogate w powtórzenia cystein	Przekazywanie sygnałów	Mcam129	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	69	21	7,8	74191	CRK37_ARATH	10/79
		Białko rybosomalne 50S z roszyny L2	Ekspresja genów	Mcam056	<i>Leptostyx terrestris</i>	PMF	48	19	11,4	30764	RK2_LEPTE	6/64
		Syntetaza alanilo-tRNA	Ekspresja genów	Mcam029	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	22	1	6,0	111275	SYA_ARATH	1/22
		Polimeraza RNA, podjednostka beta	Ekspresja genów	Mcam129	<i>Chlorella vulgaris</i>	PMF	62	13	10,5	179453	RPOC2_CHLVU	11/98
		Czynnik transkrypcyjny zależny od etylenu	Ekspresja genów	Mcam084	<i>Zea mays</i>	MS/MS	224	5,3	46849	IFA4_MAIZE	5/114	
		Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	Mcam125	<i>Zea mays</i>	MS/MS	126	7	5,3	46849	IFA4_MAIZE	3/82
		Acetylotransferaza histonów	Ekspresja genów	Mcam104	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	63	28	6,0	63483	GCN5_ARATH	11/116
		Deacetylaza histonów 2	Ekspresja genów	Mcam129	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	59	22	6,6	44062	HDA2_ARATH	5/50
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	Mcam104	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	64	26	6,2	53672	RBL_HORVU	12/80
		RuBisCO, mała podjednostka	Fotosynteza	Mcam129	<i>Lemna gibba</i>	PMF	64	48	9,2	20074	RBS3_LEMGI	4/14
		Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	Mcam056	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	7	8,9	51383	RCAA_HORVU	2/33
		Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	Mcam061	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	268	36	4,2	15207	RCAB_HORVU	3/97
		Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	Mcam070	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	64	34	9,7	24635	UCR1A_ARATH	6/70
		Białko wiążące chlorofil 2	Fotosynteza	Mcam129	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	126	8	5,8	26732	CB121_HORVU	2/82
		Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	Fotosynteza	Mcam093	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	MS/MS	65	5	9,2	41322	FENR_MESCR	1/40
		Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon	Fotosynteza	Mcam026	<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	PMF	59	39	6,5	20814	NDHL_CHLAT	7/54
		Neorganiczna pirofosfataza	Inne	Mcam039	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	52	13	5,8	24148	IPYR_HORVU	2/60
		Peroksyreduktyna dwucysteinowa (fragment)	Mechanizmy obronne	Mcam087	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	101	15	5,4	23398	BAS1_HORVU	2/44
		Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	Mcam026	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	115	4	6,6	71245	FTSH1_ORYSJ	2/61
3-2	67%	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam045	<i>Zea mays</i>	MS/MS	100	3	5,0	71581	HSP70_MAIZE	2/93
		Ligaza ubikwitylowa E3	Mechanizmy obronne	Mcam094	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	30	5	6,0	42712	ATL15_ARATH	1/33
		Białko F-box SKP2A	Mechanizmy obronne	Mcam059	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	58	21	6,9	40842	SKP2A_ARATH	7/23
		S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	Mcam006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	45	6,5	26098	GSTA_ARATH	1/98	
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam006	<i>Zea mays</i>	MS/MS	71	3	5,0	71581	HSP70_MAIZE	2/116
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam024	<i>Zea mays</i>	MS/MS	55	3	5,0	71581	HSP70_MAIZE	2/118
		Lipooksygenaza 2.1, chloroplastowa	Mechanizmy obronne	Mcam108	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	110	27	5,7	106254	LOX21_HORVU	21/81
		Białko wiążące światła ER	Mechanizmy obronne	Mcam056	<i>Solanum lycopersicum</i>	MS/MS	90	4	5,0	73475	BIP_SOLLIC	2/101
		Białko wiążące światła ER 2	Mechanizmy obronne	Mcam096	<i>Zea mays</i>	PMF	82	26	5,0	73211	BIP2_MAIZE	12/68
		Peroksyreduktyna 2E-2, chloroplastowa	Mechanizmy obronne	Mcam125	<i>Oryza sativa</i>	PMF	35	35	6,2	23279	PR2E2_ORYSJ	4/17
		Proteasom, podjednostka alfa	Mechanizmy obronne	Mcam087	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	29	7,7	27393	PSAT1_ORYSJ	1/50	
		S-transferaza glutationu (homolog)	Mechanizmy obronne	Mcam061	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	109	8	5,2	27458	INZ1B_ORYSJ	2/93
		Manganianowa dysmutaza ponadlienkowa, mitochond	Mechanizmy obronne	Mcam129	<i>Zea mays</i>	MS/MS	119	11	7,8	25529	SODM1_MAIZE	2/48
		Białko podobne do tioredoksyny	Mechanizmy obronne	Mcam043	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	76	6	6,3	32477	CDSF_ORYSJ	1/62
		Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	Mcam048	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	66	31	5,8	33898	CYSK1_ARATH	10/55
		Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego	Metabolizm azotu	Mcam029	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	46	22	6,4	49690	GSA_HORVU	9/32
		Reduktoizomeraza ketolokwasowa	Metabolizm azotu	Mcam125	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	63	4	6,0	62680	ILV5_ORYSJ	1/76
		Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	53	4	5,6	84794	gI50897038	2/91
		Hydrataza akonitanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm azotu	Mcam039	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	132	5,6	98591	ACOC_ORYSJ	3/81	
		Syntaza S-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	251	11	5,5	43257	METK2_HORVU	3/86
		Transferaza adenylowa	Metabolizm węgla	Mcam116	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	66	28	9,1	37583	IPT8_ARATH	9/56

3-2 (c.d.)	Kinaza adenylowa	Metabolizm węgla	Mcam056	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	29	7	9,4	26674	KAD1_ORYS1	1/75
	Dehydrogeza alkoholowa	Metabolizm węgla	Mcam039	<i>Malus domestica</i>	PMF	63	24	6,5	42066	ADH_MALDO	8/88
	Dikinaza glukan, woda	Metabolizm węgla	Mcam026	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	32	1	9,5	145933	GWDD2_ARATH	1/39
	Beta-fruktofuranazydaza	Metabolizm węgla	Mcam048	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	47	2	4,9	72173	INV1_MAIZE	1/73
	Beta-glukozydaza 43	Metabolizm węgla	Mcam115	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	41	3	6,9	57379	BGL43_ARATH	1/53
	Anhydraz węglanowa	Metabolizm węgla	Mcam006	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	253	12	9,9	35736	CAHC_HORVU	3/48
	Syntetaza delta-1-pirolino-5-karboksylanu	Metabolizm węgla	Mcam125	<i>Vigna oenitifolia</i>	MS/MS	35	1	6,6	73531	P5CS_VIGAC	1/58
	Enolaza	Metabolizm węgla	Mcam084	<i>Oryza sativa</i>	PMF	61	30	5,3	48285	ENO_ORYSJ	10/63
	Fruktokinaza 1	Metabolizm węgla	Mcam021	<i>Zea mays</i>	MS/MS	48	5	4,7	34840	SCRK1_MAIZE	1/71
	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	Mcam069	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	36	2	6,5	42208	ALFC_ORYS1	1/78
	Adenylotransferaza glukozy-1-fosforanu, mała podjedn.	Metabolizm węgla	Mcam021	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	95	5	6,1	56413	GLGS_HORVU	3/72
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	Metabolizm węgla	Mcam024	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	79	4	8,8	42748	GL3A_ARATH	1/93
	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	Mcam045	<i>Medicago sativa</i>	MS/MS	32	3	7,2	39458	PMFDH_MEDSA	1/75
	Syntaza skrobi	Metabolizm węgla	Mcam001	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	30	3	5,2	88671	SSV23_ORYS1	1/107
	Amoniakolaza fenyloalaninowa	Metabolizm wtórny	Mcam115	<i>Bromhesdia finlaysoniana</i>	PMF	50	3	7,1	76605	PALY_BROFI	9/86
	Monooksygenaza kwasu cytryconowego	Metabolizm wtórny	Mcam035	<i>Ruta graveolens</i>	PMF	32	2	9,8	58183	TCMO_RUTGR	1/51
	Glioksalaza I	Metabolizm wtórny	Mcam093	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	59	3	7,7	39427	LGUC_ARATH	1/33
	Białko z rodziny 14-3-3	Przekazywanie sygnałów	Mcam039	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	PMF	57	74	4,1	7716	14332_PSEMZ	3/13
	Kinaza zależna od wapnia	Przekazywanie sygnałów	Mcam035	<i>Malus domestica</i>	MS/MS	31	3	9,8	46748	KCCS_MALDO	1/63
	Kinaza bogate w powtórzenia cystein	Przekazywanie sygnałów	Mcam129	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	69	21	7,8	74191	CRK3_ARATH	10/79
	Fosfolipaza D	Przekazywanie sygnałów	Mcam021	<i>Ricinus communis</i>	PMF	57	3	5,4	92390	PLD1A_RICCO	13/107
	Fosfataza 2C (prawdopodobna)	Przekazywanie sygnałów	Mcam061	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	34	3	5,2	41241	P2C24_ARATH	1/74
	Kinaza PERK10	Przekazywanie sygnałów	Mcam035	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	38	3	6,2	81148	PERK10_ARATH	2/65
	Syntaza ATP, podjednostka beta	Transport elektronów/ionów	Mcam096	<i>Aegilops columnaris</i>	MS/MS	55	2	5,0	53865	ATPB_AEGCO	1/46
	Syntaza ATP, podjednostka gamma	Transport elektronów/ionów	Mcam056	<i>Zea mays</i>	MS/MS	80	6	9,3	40107	ATPG_MAIZE	2/101
	Transporter potasu	Transport elektronów/ionów	Mcam112	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS/MS	39	3	7,2	88253	POTS_ARATH	1/93

Tab. S2. Białka, dla których obserwowano wzrost poziomu akumulacji w liniach hodowlanych populacji mapującej MCam. Tabela w większej rozdzielczości została umieszczona na płycie CD.

Zmiana profilu akumulacji (SPADEK)	Procent białek	Nazwa białka	Funkcja biologiczna	Przykład genotypu, w którym wystąpiła zmiana w profilu akumulacji białka	Organizm	Metoda identyfikacji	Punktacja z MASCOT (p≤0,05)	Procent pokrycia sekwencji	pl (teoretyczny)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	Numer identyfikacyjny	Liczba dopasowanych peptydów
5-10	14%	Syntetaza alanylo – tRNA	Ekspresja genów	Mcam007	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	27	1	6,0	111275	SYA_ARATH	1/71
		Czynnik inicjacji transkrypcji T1D, podjednostka 1-A	Ekspresja genów	Mcam110	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	35	1	5,5	217972	TAF1A_ARATH	1/110
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	Mcam006	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	265	9	5,9	53529	RBL_HORVU	4/118
		RuBisCO, mała podjednostka	Fotosynteza	Mcam024	<i>Triticum aestivum</i>	MTT	128	11	9,8	19690	RBS1_WHEAT	2/78
		Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	Mcam024	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	443	15	8,9	51383	RCAA_HORVU	5/123
		Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon, podjednostka H, chloroplastowa	Fotosynteza	Mcam108	<i>Dioscorea elephantipes</i>	MT	52	20	5,0	45740	NDHH_DIOEL	6/89
		Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II	Fotosynteza	Mcam093	<i>Nicotiana tabacum</i>	MT	65	44	5,7	35377	PSBO_TOBAC	8/48
		Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	Mcam043	<i>Solanum lycopersicum</i>	MTT	104	4	5,8	102463	CLPAB_SOLL	3/86
		Manganianowa dysmutaza ponadlienna, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	Mcam084	<i>Zea mays</i>	MTT	206	11	7,8	25529	SODM1_MAIZE	2/47
		Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla	Mcam007	<i>Brassica napus</i>	MTT	41	3	8,8	35860	MDHM_BRANA	2/92
		Białko rybosomalne 50S L2, chloroplastowe	Ekspresja genów	Mcam094	<i>Epifagus virginiana</i>	MTT	40	13	11,5	30273	RK2_EPIVI	2/61
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	Mcam039	<i>Hordeum vulgare</i>	MT	161	36	6,2	53672	RBL_HORVU	20/111
		Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	Mcam007	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	372	15	8,9	51383	RCAA_HORVU	5/114
		Białko wiążące chlorofil	Fotosynteza	Mcam061	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	42	2	5,2	28266	CB1A_HORVU	1/80
		Syntaza celulozy (przypuszczalny homolog)	Inne	Mcam026	<i>Oryza sativa</i>	MTT	35	1	8,8	112975	CSLD5_ORYS	2/45
3-5	15%	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka proteolityczna	Mechanizmy obronne	Mcam110	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	35	17	8,9	34188	CLPP3_ARATH	4/40
		Peroksydaza askorbinowa, chloroplastowa	Mechanizmy obronne	Mcam108	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	50	26	9,0	40497	APXS_ARATH	7/73
		Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	Mcam019	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	52	3	9,8	40507	G3PA_ARATH	1/108
		Fosfatasa 2C (prawdopodobna)	Przekazywanie sygnałów	Mcam094	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	36	21	6,2	46322	P2C05_ARATH	6/60
		Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport elektronów/jonów	Mcam060	<i>Hordeum vulgare</i>	MT	103	43	5,0	53898	ATPB_HORVU	16/78
		Białko rybosomalne 30S, chloroplastowe	Ekspresja genów	Mcam112	<i>Zea mays</i>	MTT	37	36	10,8	14814	RR17_MAIZE	3/19
		Białko rybosomalne 40S, chloroplastowe	Ekspresja genów	Mcam110	<i>Zea mays</i>	MT	54	31	10,7	30112	RS4_MAIZE	7/120
		Białko rybosomalne 50S L12, chloroplastowe	Ekspresja genów	Mcam035	<i>Leptostira terrestris</i>	MT	49	19	11,4	30764	RK2_LEPTE	6/64
		Polimeraza RNA, podjednostka beta	Ekspresja genów	Mcam129	<i>Chlorella vulgaris</i>	MT	62	9	10,5	179453	RPOC2_CHLVU	11/98
		Czynnik elongacyjny Tu, chloroplastowy	Ekspresja genów	Mcam094	<i>Brachypodium distachyon</i>	MT	220	52	5,9	50638	gi357149925	22/43
		Białko wiążące chlorofil 2	Fotosynteza	Mcam129	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	126	8	5,8	26732	CB121_HORVU	2/82
		RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	273	9	5,9	53529	RBL_HORVU	4/122
		RuBisCO, mała podjednostka	Fotosynteza	Mcam079	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	289	11	6,5	47499	RBL_HORVU	4/120
		Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO	Fotosynteza	Mcam104	<i>Triticum aestivum</i>	MT	314	11	4,7	57656	RUBA_WHEAT	5/46
		Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	Mcam066	<i>Triticum aestivum</i>	MTT	63	5	8,7	24624	UCRIA_WHEAT	1/96
2-3	71%	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	Mcam056	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	208	7	8,9	51383	RCAA_HORVU	2/61
		Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	Mcam029	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	291	16	8,6	47426	RCAH_HORVU	5/82
		Oksydoreduktaza NADP+-ferredoksyna	Fotosynteza	Mcam008	<i>embryanthemum crystalli</i>	MTT	91	5	9,2	41322	FENR_MESCR	1/71
		Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon, podjednostka M, chloroplastowa	Fotosynteza	Mcam048	<i>Physcomitrella patens</i>	MTT	44	5	4,8	23401	NDHM_PHYPA	1/50
		Nieorganiczna pirofosfatasa	Inne	Mcam039	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	52	13	5,8	24148	IPYR_HORVD	2/60
		Peroksyredoksyna jedno-cysteinowa	Mechanizmy obronne	Mcam108	<i>Triticum aestivum</i>	MT	49	23	6,1	24178	REHY_WHEAT	4/60
		Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	Mcam050	<i>Solanum lycopersicum</i>	MT	118	30	5,8	102463	CLPAB_SOLL	25/96
		Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	Mcam026	<i>Oryza sativa</i>	MTT	115	4	6,6	71245	FTSH1_ORYS	2/61
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam008	<i>Zea mays</i>	MTT	144	5	5,1	70871	HSP70_MAIZE	3/70
		Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	Mcam104	<i>Zea mays</i>	MT	78	19	5,1	70871	HSP70_MAIZE	7/16
		Peroksydaza 46	Mechanizmy obronne	Mcam042	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	53	5	4,6	35735	PER46_ARATH	1/77
		Cytochrom P450	Mechanizmy obronne	Mcam116	<i>Solanum chacoense</i>	MT	22	3	9,6	57865	C71D6_SOLCH	1/43
		Peroksydaza 47	Mechanizmy obronne	Mcam026	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	28	4	7,7	35019	PER47_ARATH	1/12
		Syntaza S-adenozylcysteinowa	Metabolizm azotu	Mcam029	<i>Triticum aestivum</i>	MTT	87	2	5,6	54086	SAHH_WHEAT	1/26
		Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	Mcam048	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	66	31	5,8	33898	CYSK1_ARATH	9/55
		Reduktaza ferredoksyna-azotyn	Metabolizm azotu	Mcam043	<i>Oryza sativa</i>	MTT	112	4	7,0	66671	NIR_ORYS	2/128
		Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego	Metabolizm węgla	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	268	14	6,4	49690	GSA_HORVU	5/122
		Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	Mcam019	<i>Hordeum vulgare</i>	MTT	159	8	5,6	84794	gi150897038	4/117
		Syntaza S-adenozylmetioninowa	Metabolizm azotu	Mcam008	<i>Hordeum vulgare</i>	MT	194	61	5,4	43138	METK3_HORVU	21/83
		Beta-glukozydaza 43	Metabolizm węgla	Mcam115	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	41	3	6,9	57379	BGL43_ARATH	1/53
		Endoglukanaza 16	Metabolizm węgla	Mcam125	<i>Oryza sativa</i>	MTT	60	4	5,9	59198	GUN16_ORYS	1/35
		Fruktokinaza 1	Metabolizm węgla	Mcam069	<i>Oryza sativa</i>	MTT	60	4	5,1	34878	SCRK1_ORYS	1/48
		Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	Mcam029	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTT	104	3	9,8	40507	G3PA_ARATH	1/48
		Karboksylaza fosfenoilpirogrotonianowa	Metabolizm węgla	Mcam125	<i>Picea abies</i>	MT	59	20	5,9	109996	CAPP_PICAB	16/96
		Fosforibulokinaza	Metabolizm węgla	Mcam108	<i>Triticum aestivum</i>	MT	58	30	5,7	45512	KPRP_WHEAT	10/72
		Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	Mcam007	<i>Medicago sativa</i>	MT	52	8	7,8	39458	MDH_MEDSA	2/48
		Kinaza fosfatydylinozytolu	Przekazywanie sygnałów	Mcam050	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	50	12	6,3	94294	PI3K_ARATH	9/19
		Kinaza PERK1D	Przekazywanie sygnałów	Mcam104	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MT	58	14	6,2	81448	PERK1D_ARATH	7/31
		Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport elektronów/jonów	Mcam050	<i>Hordeum vulgare</i>	MT	73	37	6,3	55317	ATPA_HORVU	16/115
		Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport elektronów/jonów	Mcam060	<i>Hordeum vulgare</i>	MT	103	43	5,0	53898	ATPB_HORVU	16/78
		Syntaza ATP, podjednostka gamma, chloroplastowa	Transport elektronów/jonów	Mcam129	<i>Zea mays</i>	MTT	110	6	9,3	40107	ATPG_MAIZE	2/53

Tab.S3. Białka, dla których monitorowano zmiany w profilach akumulacji w liniach hodowlanych populacji mapującej MCam i genotypach rodzicielskich. Kolor czerwony - białka, dla których średni efekt suszy był istotny statystycznie, kolor niebieski - białka, dla których interakcja genotyp $\times$ susza była istotna statystycznie, kolor zielony - białka, dla których średni efekt suszy i interakcja genotyp $\times$ susza były istotne statystycznie. Tabela w większej rozdzielczości została umieszczona na płycie CD.

Numeracja na liście	Linia genotypowa wchodzących w skład profilu	Nazwa białka	Proces biologiczny	Współczynnik korelacji pomędzy postawami biologicznymi	p-wartość dla relacji pomędzy biologicznymi	p-wartość dla efektu suszy	p-wartość dla interakcji pomędzy w suszy	Średnia wartość plonki w kontrol (kg/100% w suszy)	Średnia wartość plonki w suszy (kg/100% w suszy)	Effekt suszy	Organizm	Metoda identyfikacji	Punkcja z MASCOT (p<0.05)	Procent pokrycia sekwencji	pl (teoretyczny)	Masa cząsteczkowa (teoretyczna) [Da]	pl (eksperymentalny)	Masa cząsteczkowa (eksperymentalna) [Da]	Numer identyfikacji	Liczba dopozysanych populacji
1	102	Albikaza frakcji-1-1-kidofonoma	Metabolizm węgl.	0.02	0.00E+00	4.01E-05	3.95E-05	5.39	5.29	-0.09	<i>Oryza sativa</i>	MS/MS	48	2	6.5	42208	6.46	58670	ALPC_ORY.SJ	1448
2	102	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	2.74E-24	2.69E-01	7.22	7.38	0.16	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	39	3	8.9	51383	5.51	60414	RCGA_HORVU	5130
3	102	Białko zależne od postawienia tiaminy	Inne	0.79	0.00E+00	2.62E-02	2.62E-02	6.04	5.90	-0.14	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	103	37	6.0	74032	5.67	84136	g02693372	1034
4	102	Białko kompleksu rozkładającego węglę fosforanowy II	Fotosynteza	0.05	0.00E+00	1.47E-01	7.07E-04	6.80	6.80	-0.01	<i>Triticum aestivum</i>	PMF	71	32	6.84	23714	5.96	31721	gH077556	7039
5	100	Urybylformena glukozy-1-6-dofonoma	Metabolizm węgl.	0.72	0.00E+00	2.09E-01	6.01E-02	5.89	5.91	0.02	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	62	18	5.73	52058	5.6	84111	gH1527947	7021
6	99	Urybylformena glukozy-1-6-dofonoma	Metabolizm węgl.	0.75	0.00E+00	4.02E-01	8.75E-03	5.17	5.29	0.12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	62	18	5.73	52058	5.63	84890	UPAI_ARATH	7021
7	98	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	0.00E+00	2.77E-14	5.32	4.80	-0.52	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	208	3	8.9	51383	5.45	58681	RCGA_HORVU	2481
8	97	Aktynowa RuLiCO, informacja II	Fotosynteza	0.03	0.00E+00	0.00E+00	8.63E-01	2.42	3.99	-1.56	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	244	3	8.7	47009	5.59	60414	RCGA_HORVU	4607
9	98	Białko wiążące zeta podjednostki RuLiCO, podjednostka beta	Mechanizm obrony	0.73	0.00E+00	3.00E-01	5.49E-05	4.75	4.66	-0.09	<i>Zea mays</i>	PMF	71	6.1	7.071	40634	5.18	61871	MAIZE	2481
10	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
11	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
12	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
13	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
14	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
15	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
16	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
17	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
18	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
19	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
20	96	Isomazna tlenofosforanowa	Fotosynteza	0.02	0.00E+00	3.04E-01	1.90E-01	4.80	4.80	0.01	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	170	48	7.04	32879	5.41	62649613	RCGA_HORVU	1427
21	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
22	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
23	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
24	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
25	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
26	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
27	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
28	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
29	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
30	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
31	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
32	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
33	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
34	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
35	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
36	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
37	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
38	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
39	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
40	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
41	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
42	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
43	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
44	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
45	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
46	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
47	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
48	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
49	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
50	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
51	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
52	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
53	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
54	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
55	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.04	0.00E+00	0.00E+00	5.77E-12	4.59	4.85	0.26	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	137	3	5.5	47009	5.62	60403	METKA_HORVU	384
56	93	Aktynowa RuLiCO, informacja	Fotosynteza	0.06	0.00E+00	0.00E+00	5.04E-16	3.70	2.88	-0.72	<i>Hordeum vulgare</i>	MS/MS	92	3	8.9	51383	5.84	47971	RCGA_HORVU	203
57</																				

93	79	Aktynowa RutinCO, Informa A	Fotosynteza	0.71	2.08E-37	1.57E-02	3.01	3.70	-0.21	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	362	3	8.9	51383	3.73	50280	RCGA_HORVU	471		
94	79	5-tranilina glicydio	Mechanizmy obrony	0.54	2.62E-32	5.56E-02	3.17	3.22	0.05	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	112	34	8.91	33884	0.55	29628	g02607956	814		
95	79	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.53	1.95E-25	1.36E-02	3.40	3.54	0.14								82392				
96	79	Ekspresja genów	Niesiana	0.59	2.59E-29	1.56E-03	4.11	4.06	-0.05	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	28	7	11.7	31179	0.23	32311	KE2_ANTO	157		
97	78	Amionolabiala fenilalanina	Metabolizm węglowy	0.50	9.74E-35	1.97E-36	3.06E-06	2.93	2.92	0.30	<i>Brassica napus</i>	PMF	50	3	7.1	76605	5.44	37390	PALY_BROFI	986	
98	78	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.47	2.54E-33	7.05E-04	1.81E-02	3.31	3.38	0.07	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	33	18	9.35	36261	6.4	59019	NA102_ARATH	316	
99	78	Czynnik transkrypcyjny z rodziny NAC	Ekspresja genów	0.78	1.03E-27	2.03E-02	4.35	4.50	-0.15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	25	2	4.8	47347	4.46	61286	MRS25_ARATH	1023		
100	78	Transfery magnezji MRS2-5	Transfery jonów/elektronów	0.54	3.28E-30	1.25E-27	3.46E-01	3.20	3.06	-0.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	25	2	4.8	47347	4.46	61286	MRS25_ARATH	1023	
101	78	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.41	2.21E-18	1.42E-06	2.39E-05	3.69	3.80	0.11							93635				
102	77	Brakujące wiązanie danych podłożystych RutinCO, podłożysta beta	Fotosynteza	0.53	1.09E-24	4.97E-01	3.33	3.53	0.01	<i>Secale cereale</i>	PMF	52	3	4.7	53721	5.32	76283	RUBB_SECE	949		
103	77	Syntaza metioniny	Metabolizm azotu	0.75	0.00E+00	7.54E-39	6.06E-03	4.54	4.85	0.31	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	159	3	8.0	84794.0	5.60	61	80578	g0007008	4017
104	77	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.58	2.18E-33	1.07E-02	2.08	2.08	-0.22								34237				
105	77	Metabolizacja cykloksy zalecia od ATP	Mechanizmy obrony	0.49	1.18E-23	1.94E-22	4.45E-05	2.88	3.21	0.34	<i>Oryza sativa</i>	MSMS	36	3	6.0	72750	5.05	37826	FTSH6_ORYS	147	
106	76	Brakujące wiązanie danych odczytanych endonukleazy 2	Mechanizmy obrony	0.05	0.00E+00	3.93E+00	2.01E-26	2.57	3.53	0.97	<i>Zea mays</i>	PMF	82	3	5.0	72121	5.24	85996	RIP2_MAIZE	1268	
107	75	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Mechanizmy obrony	0.69	3.55E-28	1.47E-02	3.39	3.16	-0.23	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	71	3	5.0	71561	5.16	43975	HSP70_MAIZE	2016		
108	76	Syntaza metioniny	Metabolizm azotu	0.69	2.38E-37	4.95E-02	3.47E-03	3.31	3.35	0.04	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	MSMS	112	4	5.9	65564	5.90	85357	METE_MESCR	396	
109	75	Dydymogena polikromowa, nitrochondria	Metabolizm węglowy	0.65	2.90E-29	1.47E-02	5.02E-02	4.42	4.48	0.06	<i>Brassica napus</i>	MSMS	41	3	8.81	35880	6.76	52303	MDHM_BRANA	292	
110	75	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.63	3.73E-32	2.03E-02	3.79	3.81	-0.03								38524				
111	76	Hemoglobina biala z rodziny 14-3-3	Mechanizmy obrony	0.64	6.26E-25	5.39E-04	1.05E-02	3.45	3.43	0.02	<i>Pandanus tomentosus</i>	PMF	57	74	4.1	7716	4.8	41963	1432_PSEMJ	313	
112	76	Syntaza ATP, podłożysta gamma, nitrochondria	Transfery jonów/elektronów	0.80	0.00E+00	1.01E-02	1.36E-02	3.60	3.64	0.04	<i>Zea mays</i>	MSMS	80	6	5.3	40107	5.6	81596	ATPO_MAIZE	2101	
113	76	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.64	0.00E+00	2.45E-02	1.36E-02	4.05	3.65	-0.40											
114	75	Mediator podłożystki transkrypcyjnej polimerazy II RNA (transdopodolity)	Mechanizmy obrony	0.71	7.64E-39	1.29E-26	3.55E-02	4.00	3.65	-0.35	<i>Musa domestica</i>	PMF	80	19	5.4	71346	5.21	84136	g05766979	1124	
115	75	Aktynowa RutinCO, Informa A	Fotosynteza	0.70	5.05E-31	1.46E-26	1.26E-03	4.04	4.43	0.39	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	143	199	3	6.9	51383	3.13	67479	RCGA_HORVU	2464
116	75	Aktynowa RutinCO, Informa A	Fotosynteza	0.61	7.89E-31	7.62E-04	1.67E-03	3.98	4.07	0.10	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	114	3	8.04	51383	5.64	57013	RCGA_HORVU	373	
117	75	Syntaza 5-adenosylmetioniny	Metabolizm azotu	0.57	1.94E-28	2.27E-05	1.12E-03	3.29	3.21	-0.08	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	107	3	5.5	43609	5.08	96519	MEITKA_HORVU	2045	
118	75	Immunoglobulina G	Fotosynteza	0.57	0.00E+00	1.28E-01	1.43E-06	4.64	4.69	0.05	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	116	3	5.3	26568	4.07	25878	TPS_HORVU	1441	
119	75	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.70	0.00E+00	1.38E-01	2.15E-02	3.40	3.42	0.03											
120	75	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.56	5.66E-27	1.40E-02	1.54E-02	3.27	3.37	0.10											
121	75	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.65	4.79E-30	1.46E-01	1.29E-06	3.32	3.26	-0.06											
122	75	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.77	0.00E+00	4.42E-18	2.65E-04	3.46	3.65	0.19	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	125	40	6.34	25124	5.83	34948	Q3MP2_HORVU	916	
123	76	5-tranilina glicydio	Mechanizmy obrony	0.58	2.77E-36	1.47E-02	1.78E-03	3.56	3.70	0.14	<i>Oryza sativa</i>	PMF	61	35	5.3	24372	5.31	27739	IPYR_ORYS	629	
124	74	Nieopracowana podłożystka	Inne	0.73	0.00E+00	6.53E-29	8.70E-36	3.36	3.63	0.28	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	38	3	6.0	6702	5.14	36430	APXT_ARATH	690	
125	74	Peroksydaza azobenzylowa	Mechanizmy obrony	0.60	2.37E-21	1.02E-01	8.86E-01	4.15	4.33	0.17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	58	3	7.0	46252	5.14	34575	g05766979	1124	
126	75	Immunoglobulina G	Fotosynteza	0.65	1.90E-21	1.27E-02	8.40E-02	3.07	3.09	-0.02	<i>Agrostis tauschii</i>	PMF	184	56	5.1	27764	5.21	37643	g05766979	1124	
127	74	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.44	5.75E-33	1.42E-02	3.54	3.37	-0.17												
128	74	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Mechanizmy obrony	0.60	1.26E-24	2.67E-01	1.86E-06	4.05	4.48	-0.43	<i>Zea mays</i>	MSMS	63	3	5.0	71361	5.16	86224	HSP70_MAIZE	2094	
129	74	Ekspresja genów	Ekspresja genów	0.28	6.52E-12	9.24E-01	1.90E-01	3.27	3.28	0.01	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	60	20	8.6	39448	6.1	56751	CHIL_ARATH	630	
130	73	Cyklin H1	Regulacja cyklu komórkowego	0.84	0.00E+00	0.99E+00	2.12E-32	3.74	4.25	-0.51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	60	20	8.6	39448	6.1	56751	CHIL_ARATH	630	
131	73	Transkrypcja sekcji, chloroplastowa	Transfery jonów/elektronów	0.69	3.03E-29	1.46E-02	1.78E-03	3.29	3.22	-0.07	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	38	3	6.0	6702	5.14	36430	APXT_ARATH	690	
132	73	Transfery jonów/elektronów	Inne	0.64	2.13E-28	1.04E-01	1.77E-01	3.88	3.73	-0.15											
133	73	Tubulina, luteus beta-2	Brakujące wiązanie danych	0.54	4.07E-17	1.40E-01	2.75E-02	2.23	2.16	-0.06	<i>Zea mays</i>	MSMS	30	3	6.7	50535	6.56	20121	TB22_MAIZE	11116	
134	73	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Brakujące wiązanie danych	0.63	1.94E-28	1.46E-02	1.78E-03	3.29	3.22	-0.07	<i>Oryza sativa</i>	PMF	73	3	5.3	50535	6.56	20121	TB22_MAIZE	11116	
135	73	Peroksydaza azobenzylowa (fragment)	Mechanizmy obrony	0.61	0.00E+00	1.46E-02	1.78E-02	4.86	4.98	0.12	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	101	15	5.4	23398	4.79	26226	BASI_HORVU	244	
136	73	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.69	1.26E-30	1.68E-02	1.43E-06	2.05	2.91	0.86											
137	73	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.69	1.77E-30	1.95E-02	3.01	3.12	0.11												
138	72	Lipidolabiala indolowa temperant	Mechanizmy obrony	0.68	6.62E-28	4.95E-29	3.06E-07	2.71	3.22	0.51	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	153	57	5.5	2185	5.55	19932	g0774465	1117	
139	72	Dydymogena manihila (transdopodolity)	Metabolizm węglowy	0.29	5.52E-37	6.47E-01	1.41E-01	2.98	2.98	0.00	<i>Medicago sativa</i>	MSMS	3	32	7.8	39408	6.46	36657	MDH1_MEDSA	1018	
140	72	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Transfery jonów/elektronów	0.51	2.14E-37	5.26E-02	3.53	3.23	-0.30	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	113	52	5.3	33327	4.87	48807	g05766979	1124		
141	71	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Mechanizmy obrony	0.57	2.96E-26	3.89E-15	7.03E-04	4.78	4.56	-0.22	<i>Zea mays</i>	MSMS	144	3	5.1	70871	4.77	86230	HSP70_MAIZE	370	
142	71	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.71	3.48E-36	1.27E-02	3.02	3.22	0.20												
143	71	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.72	0.00E+00	4.28E-23	5.86E-06	3.33	3.12	-0.21											
144	71	Nieopracowana podłożystka	Inne	0.48	1.71E-18	6.59E-01	2.66E-01	3.25	3.23	-0.02	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	52	3	5.8	24148	6.25	41576	IPYR_HORVU	280	
145	71	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.67	0.00E+00	4.78E-04	2.83E-03	3.98	3.06	-0.92											
146	71	Apocynonin I	Fotosynteza	0.55	3.78E-26	9.99E-36	1.07E-01	4.37	4.57	0.20	<i>Cucumis granatensis</i>	PMF	62	27	9.9	35513	4.98	48024	CVE_CUSGR	620	
147	71	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.60	0.00E+00	1.53E-02	6.06E-03	3.55	3.85	0.30											
148	71	Brakujące wiązanie danych 70 kDa	Fotosynteza	0.61	1.84E-36	1.53E-01	4.39	4.44	0.05	<i>Agrostis tauschii</i>	PMF	117	26	6.15	41883	5.38	48984	FT73_32419	1015		
149	71	Syntaza cytydina	Metabolizm azotu	0.70	1.90E-30	9.79E-12	1.54E-01	3.04	4.08	0.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	49	31	5.8	33986	5.22	51780	CTSKI_ARATH	1027	
150	70	Polidolabiala fenilalanina-azoty	Metabolizm azotu	0.50	1.54E-24	1.54E-02	1.90	4.20	2.60		<i>Oryza sativa</i>	MSMS	110	3	7.0	68871	5.14	75415	NR1_ORYS	2014	
151	70	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.72	0.00E+00	3.22E-03	1.05E-06	3.49	3.45	-0.04											
152	70	Dydymogena indolopodolity	Metabolizm węglowy	0.70	1.93E-40	1.10E-01	3.07E-03	3.72	3.81	0.09	<i>Brachypodium distachyon</i>	PMF	93	25	5.61	52860	5.07	68790	g05766979	1124	
153	70	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.61	0.00E+00	1.10E-01	3.07E-03	3.72	3.81	0.09											
154	69	Amionotransferaza	Metabolizm azotu	0.67	0.00E+00	9.94E-13	2.70E-05	3.53	3.41	-0.11	<i>Oryza sativa</i>	PMF	84	37	6.1	43401	6.4	63497	g05766979	1124	
155	69	Niezidentyfikowane	Niesiana	0.61	1.08E-31	1.53E-02	1.22E-03	2.82	2.89	0.07											
156	69	Syntaza ATP, podłożysta beta, chloroplastowa	Transfery jonów/elektronów	0.53	5.65E-21	3.68E-01	3.95E-01	3.65	3.67	0.02	<i>Agrostis tauschii</i>	MSMS	55	2	5.0	53805	6.08	43622	ATPB_AEGGO	146	
157	68	Oksydolabiala NADP+formolabiala, chloroplastowa	F																		

205	56	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.66	3.11E-28	8.81E-03	4.07E-03	3.31	3.38	0.07							6.04	38049		
206	56	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.52	2.84E-17	1.13E-03	7.07E-04	2.72	2.84	0.12							5.76	43756		
207	56	Biutka rybowodna z rodziny L2	Ekspresja genow	0.07	1.69E-30	1.53E-02	6.22E-06	3.68	3.64	-0.05							6.34	51170	RK2_EPIV1	261
208	56	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.54	3.12E-13	4.94E-02	3.32E-03	3.24	3.31	0.07	<i>Epilagus virginiana</i>	MSMS	40	13	11.5	30273	6.35	62248		
209	56	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.62	3.28E-20	3.42E-03	5.04E-02	3.12	3.20	0.07							6.15	67043		
210	55	Biutka rybowodna S05	Ekspresja genow	0.76	3.06E-27	7.23E-01	2.90E-01	2.42	2.89	-0.01	<i>Oryza sativa</i>	MSMS	180	17	5.36	18579	6.01	25180	RK12_ORY_SJ	275
211	55	Systina 5-adenosylmetioninowa 3	Metabolizm azotu	0.77	1.77E-20	1.03E-03	3.35E-02	3.56	3.66	0.10	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	194	3	5.4	43138	5.7	47653	MTK3_HORVU	21083
212	55	Peroksydaza azobenzonowa	Mechanizmy obrony	0.67	7.71E-20	1.63E-04	6.57E-02	4.67	4.87	0.20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	45	3	7.0	46262	5.92	73496	APT1_ARATH	676
213	55	Aktynowa F-aktynowa, informacja A	Fotosynteza	0.86	2.18E-35	1.99E-01	1.05E-01	3.06	3.21	0.15	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	328	3	8.9	51383	5.26	69536	RCGA_HORVU	40109
214	54	Biutka wiązowa data podjętowa BiutkaCO ₂ podjętowa alfa	Fotosynteza	0.75	2.32E-14	4.35E-01	6.17E-01	5.23	5.14	-0.09	<i>Triticum aestivum</i>	PMF	314	3	4.7	57056	4.66	78468	RUBA_WHEAT	546
215	54	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.59	7.94E-21	7.46E-02	1.18E-01	3.18	3.21	0.03							5.76	37390		
216	54	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.62	2.90E-28	1.05E-01	3.03E-03	2.19	2.22	0.03							5.9	48992		
217	54	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.79	6.02E-31	2.55E-15	8.69E-04	4.15	3.94	-0.21							5.18	27590		
218	54	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.50	1.50E-07	1.18E-02	2.30E-01	2.66	2.73	0.08	<i>Oryza sativa</i>	MSMS	48	2	6.5	42208	6.09	62071	ALPG_ORY_SJ	148
219	53	Dehydrogenaza glukozowa, natlenkowadna	Metabolizm węgla	0.55	7.76E-13	7.42E-01	1.69E-03	4.36	4.36	0.06	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	103	40	5.62	75020	6.02	53437	gH2609040	4015
220	53	Aktynowa F-aktynowa, informacja B	Fotosynteza	0.89	0.00E+00	1.72E-07	1.15E-06	4.61	4.50	-0.11	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	178	3	8.6	47426	5.71	63467	RCAB_HORVU	473
221	53	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.44	7.00E-16	2.13E-03	1.67E-02	2.60	2.66	0.06							5.92	79883		
222	53	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.56	3.47E-17	4.38E-03	3.66E-01	4.72	4.85	0.12							6.05	94422		
223	53	Niezidentyfikowane	Mechanizmy obrony	0.56	1.74E-21	1.62E-04	3.52E-01	4.19	4.30	0.11							5.12	25790		
224	52	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.56	0.00E+00	1.62E-04	1.68E-02	3.05	3.29	0.24							6.05	77972		
225	50	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.72	0.00E+00	1.62E-04	2.05E-01	2.68	2.85	0.17							6.01	38087		
226	50	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicynowego B, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.70	3.53E-17	0.03E+00	0.95E-04	4.04	3.84	-0.20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	98	3	9.8	40507	5.72	64949	GPBA_ARATH	11110
227	50	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.72	0.00E+00	1.62E-04	0.41E-02	3.06	3.19	0.13							5.51	62131		
228	48	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.75	0.00E+00	0.00E+00	3.10E-04	3.13	3.77	0.63							5.07	55094		
229	48	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.64	6.20E-15	7.71E-03	7.35E-01	2.87	2.98	0.11							5.85	38524		
230	48	Reduktaza glutaminy	Mechanizmy obrony	0.66	0.00E+00	2.13E-01	2.29E-04	3.00	2.97	-0.04	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	87	28	7.64	59613	6.1	74805	gH15780217	1354
231	48	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.48	1.59E-15	1.17E-01	6.16E-01	2.52	2.56	0.05							6.07	33988		
232	48	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.62	0.00E+00	3.03E-03	1.06E-03	3.20	3.29	0.09							6.08	25180		
233	47	Aktynowa F-aktynowa, informacja B	Fotosynteza	0.87	2.66E-32	0.00E+00	7.96E-02	3.22	3.71	0.49	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	291	3	47.626	8.60	589	77247	RCAB_HORVU	582
234	47	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.53	1.33E-09	1.42E-02	1.45E-01	2.66	2.52	-0.14							5.8	76113		
235	47	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.37	2.75E-13	1.66E-04	1.74E-01	2.43	2.49	0.06							6.58	48553		
236	47	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.62	2.09E-21	9.24E-01	5.76E-02	3.52	3.52	0.00							5.87	74194		
237	47	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.79	2.00E-15	2.70E-02	5.53E-01	2.75	2.70	-0.05							6.1	18203		
238	47	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.60	1.08E-19	8.52E-02	1.98E-01	4.54	4.59	0.05							6.39	73499		
239	46	Dehydrogenaza natruku (przewodnika)	Metabolizm węgla	0.57	4.89E-15	1.63E-02	1.66E-01	2.75	2.61	-0.14	<i>Medicago sativa</i>	MSMS	32	3	7.8	39458	5.82	24220	MTDH_MEDSA	1465
240	45	Reduktaza CO ₂ data podjętowa	Fotosynteza	0.77	1.22E-32	2.46E-15	1.36E-06	5.80	5.33	-0.47	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	292	3	6.2	53445	6.71	67217	RBL_WHEAT	40129
241	45	Systina glutaminy, chloroplastowa	Metabolizm azotu	0.26	3.86E-07	3.63E-03	1.91E-01	6.70	6.62	-0.08	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	119	40	5.75	46962	5.09	63262	gH578742	1223
242	44	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.53	2.48E-13	3.49E-03	1.56E-03	3.39	3.44	0.04							6.21	51170		
243	44	Biutka zawierająca domowy W60	Mutacje	0.74	0.00E+00	1.62E-03	2.02E-03	3.56	3.44	-0.12	<i>Coccyzus subellipticus</i>	PMF	55	12	7.63	47617	6.4	59821	gH45381453	4622
244	44	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.79	3.95E-37	1.72E-04	3.05E-02	3.75	3.79	0.04							6.05	52391		
245	43	Biutka z nowym "T-box"	Przekazywanie sygnałów	0.77	1.34E-25	4.81E-02	1.79E-04	3.07	3.11	0.04	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMF	58	21	7.9	40842	5.48	49338	SKP2A_ARATH	7023
246	43	Reduktaza CO ₂ data podjętowa	Fotosynteza	0.81	2.33E-15	1.69E-03	1.53E-04	3.48	3.71	0.23	<i>Lemna gibba</i>	PMF	63	3	9.2	28974	6.11	54833	RRS2_LEMGI	110103
247	42	Systina ATP, podjętowa alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektrolitów	0.56	0.00E+00	1.62E-04	3.60E-03	3.52	3.74	0.22	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	73	37	6.3	55317	6.02	75938	ATPA_HORVU	14115
248	40	Oksydoreduktaza NADH+formoksydaza, chloroplastowa	Fotosynteza	0.89	1.77E-17	3.55E-17	3.76E-07	3.94	3.44	-0.50	<i>Meibomiastrum crystallinum</i>	MSMS	133	5	9.2	41322	6.49	49861	FENR_MESCR	1052
249	40	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.48	1.14E-13	1.22E-03	0.65E-02	2.80	2.71	-0.09							6.33	49607		
250	39	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.59	3.09E-21	1.62E-02	1.62E-02	2.94	3.07	0.13							6.47	80910		
251	38	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.80	4.03E-29	1.11E-02	1.26E-03	4.08	4.12	0.04	<i>Hordeum vulgare</i>	PMF	198	53	6.06	38102	5.83	74281	gH324693652	12115
252	35	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.60	1.72E-07	1.42E-01	3.56E-01	3.35	3.31	-0.04							6.26	75851		
253	32	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.56	1.91E-13	1.73E-04	1.09E-02	2.62	2.77	0.15							6.1	68874		
254	29	Aktynowa F-aktynowa, informacja A	Fotosynteza	0.71	2.08E-13	1.09E-03	4.52E-02	4.12	3.98	-0.22	<i>Hordeum vulgare</i>	MSMS	146	3	8.9	51383	5.98	58221	RCGA_HORVU	290
255	29	Sekwestracja-1,7-bisfosforanu	Fotosynteza	0.65	7.71E-05	7.54E-15	5.21E-01	5.32	5.73	0.40	<i>Triticum urartu</i>	PMF	62	40	5.74	40102	5.22	61722	gH74425491	1568
256	27	Eugenina cukru nukleozydo-difosforanowego	Metabolizm węgla	0.38	1.73E-05	5.24E-01	3.37E-01	3.51	3.14	0.40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSMS	28	20	10.41	48677	6.37	54396	GAE4_ARATH	584
257	21	Niezidentyfikowane	Nierazna	0.65	2.96E-49	2.35E-04	4.02E-02	2.79	2.71	-0.08							5.72	88849		

Tab. S4. Różnice (Cam/B1/CI - Maresi) w profilach akumulacji białek w kontroli i suszy.
-1 – wyższy poziom akumulacji białka w Maresi; **0** – równy poziom akumulacji; **1** – wyższy poziom akumulacji białka w Cam/B1/CI, ***** – brak obserwacji.

Numeracja na żelu	Nazwa białka	Funkcja biologiczna	Różnica w kontroli	Różnica w suszy	Znak różnicy w kontroli	Znak różnicy w suszy
1	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	-0.148	0.059	-1	0
2	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.108	0.154	0	1
3	Białko zależne od pirofosforanu timiny	Inne	-0.479	0.381	-1	1
4	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	0.018	0.090	0	1
5	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	-0.319	0.295	-1	1
6	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	-0.292	0.011	-1	0
7	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	0.136	0.493	0	0
8	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	-0.271	0.540	-1	1
9	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	*	0.549	*	1
10	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	-0.019	0.225	0	1
11	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	-0.013	0.214	0	1
12	Czynnik elongacyjny Tu	Ekspresja genów	-0.066	0.275	0	1
13	Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.056	0.396	0	1
14	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.161	-0.180	0	1
15	Perooksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	0.230	-0.188	1	-1
16	Czynnik elongacyjny Tu, chloroplastowy	Ekspresja genów	-0.220	0.373	0	1
17	Kinaza 3-fosfoglicerynianowa	Fotosynteza	0.146	0.184	1	1
18	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	Fotosynteza	-0.387	0.266	-1	1
19	Syntaza S-adenozylometioninowa 2	Metabolizm azotu	0.042	0.219	0	0
20	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	*	*	*	*
21	Anhidraza węglanowa	Metabolizm węgla	-0.004	-0.003	0	0
22	Oksydoreduktaza NADP+; ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	0.149	0.227	1	1
23	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	-0.440	0.191	-1	0
24	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	-0.062	-0.692	0	-1
25	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	-0.172	0.286	0	1
26	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	-0.567	0.451	-1	1
27	Oksydoreduktaza NADP+; ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	-0.126	0.100	0	0
28	Proteaza zależna od cynku	Mechanizmy obronne	0.080	0.046	0	0
29	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	-0.132	0.179	-1	1
30	Oksydoreduktaza NAD(P)H: chinon	Fotosynteza	0.002	-0.040	0	0
31	Kinaza adenylanowa	Metabolizm węgla	0.132	0.109	0	0
32	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	0.120	-0.384	0	-1
33	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.140	0.222	1	1
34	Oksydoreduktaza NADP+; ferredoksyna, chloroplastowa	Fotosynteza	-0.173	0.109	-1	1
35	Niezidentyfikowane	Nieznaną	*	*	*	*
36	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	*	-1.135	*	-1
37	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	-0.633	0.143	-1	0
38	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.500	0.470	1	1
39	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	Fotosynteza	-0.322	0.027	-1	0
40	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.615	0.434	1	1
41	Białko wiążące chlorofil	Fotosynteza	0.268	-0.018	1	0
42	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.044	0.194	0	0
43	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	0.022	0.178	0	1
44	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	0.224	0.138	0	0
45	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	0.166	0.225	0	0
46	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	*	*	*	*
47	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.048	0.412	0	1
48	Manganianowa dysmutaza nadciśnieniowa, mitochondrialna	Mechanizmy obronne	*	-0.122	*	0
49	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	-0.172	0.207	-1	1
50	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	-0.197	0.089	0	0
51	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	0.161	-0.337	0	-1
52	Pirofosfataza ADP-glukozy	Metabolizm węgla	*	0.396	*	1
53	Niezidentyfikowane	Nieznaną	-0.170	-0.565	-1	-1
54	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.168	0.310	0	1
55	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	0.087	0.256	1	1
56	Fosforybulokinaza, chloroplastowa	Fotosynteza	-0.549	0.158	-1	1
57	Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna	Metabolizm węgla	0.162	0.274	0	0
58	Urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa	Metabolizm węgla	-0.502	-0.389	-1	-1
59	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	-0.601	-0.147	-1	0
60	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II	Fotosynteza	-0.175	0.252	-1	1
61	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	-0.538	0.499	-1	1
62	Epimeraza cukru nukleozydo-difosforanowego	Metabolizm węgla	-0.067	0.163	0	1
63	Niezidentyfikowane	Nieznaną	-0.286	-0.215	0	0
64	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.135	0.228	1	1
65	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.026	0.198	0	0
66	Czynnik inicjacji translacji 4A	Ekspresja genów	-0.084	0.340	0	1
67	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.145	0.130	0	0
68	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	-0.379	-0.326	-1	-1
69	Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego	Mechanizmy obronne	*	*	*	*
70	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.259	1.147	1	1
71	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	1.027	0.323	1	1
72	Aktyna (fragment)	Inne	0.013	0.193	0	1
73	Kazeino-lityczna proteaza serynowa, podjednostka regulatorowa	Mechanizmy obronne	-0.609	0.587	-1	1
74	Peroksydoreduktaza 2E-2	Mechanizmy obronne	*	*	*	*
75	Reduktaza dehydroaskorbinianu	Mechanizmy obronne	0.168	0.035	0	0
76	Niezidentyfikowane	Nieznaną	1.010	-0.140	1	0
77	Białko szoku cieplnego 20 kDa	Mechanizmy obronne	-0.121	0.115	-1	1
78	Syntaza S-adenozylometioninowa 1	Metabolizm azotu	-0.026	0.472	0	1
79	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.292	-0.173	0	0
80	Enolaza	Metabolizm węgla	0.082	0.828	0	1
81	Niezidentyfikowane	Nieznaną	0.527	0.171	1	0
82	Białko hipotetyczne	Nieznaną	-0.223	0.438	-1	1
83	Wakuolarna pompa protonowa (ATPaza)	Transport jonów/elektronów	0.192	0.525	0	1
84	Glioksalaza I	Metabolizm wtórny	0.268	0.116	1	0
85	Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	0.737	-0.264	1	0
86	Dehydrogenaza izocytrynianowa	Metabolizm węgla	-0.334	0.088	-1	1
87	Adenylotransferaza glukozy-1-fosforanu, mała podjednostka	Metabolizm węgla	-0.044	0.099	0	0
88	Aminomutaza semialdehydu glutaminianowego	Metabolizm azotu	-0.391	-0.340	-1	-1
89	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	*	*	*	*
90	Kompleks żelazo-siarkowy cytochromu b6f	Fotosynteza	0.055	-0.044	0	0
91	Niezidentyfikowane	Nieznaną	-0.237	-0.594	0	-1
92	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	-0.254	-0.136	-1	0
93	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.234	0.363	0	1
94	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	*	-0.547	*	0
95	Niezidentyfikowane	Nieznaną	*	0.065	*	0
96	Białko rybosomalne z rodziny L2	Ekspresja genów	*	0.108	*	0
97	Amoniakoliza fenylalaninowa	Metabolizm wtórny	0.753	0.133	1	0
98	Niezidentyfikowane	Nieznaną	-0.580	0.103	-1	0
99	Czynnik transkrypcyjny z rodziny NAC	Ekspresja genów	-0.336	-0.456	-1	-1

100	Transporter magnezu MRS2-5	Transport jonów/elektronów	0.056	-0.763	0	-1
101	Niezidentyfikowane	Niezna	0.414	0.112	1	0
102	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka beta	Fotosynteza	0.953	0.260	1	0
103	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	0.017	0.008	0	0
104	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.346	0.019	-1	0
105	Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.671	0.092	1	0
106	Białko wiążące światła retikulum endoplazmatycznego 2	Mechanizmy obronne	0.155	-0.308	0	-1
107	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	-0.213	0.553	-1	1
108	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	-0.533	0.223	-1	0
109	Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla	0.111	0.520	0	1
110	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.008	0.069	0	0
111	Homolog białka z rodziny 14-3-3	Mechanizmy obronne	0.338	-0.083	1	0
112	Syntaza ATP, podjednostka gamma, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	0.517	-0.397	1	0
113	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.387	0.011	-1	0
114	Mediator podjednostki transkrypcyjnej polimerazy II RNA (prawdopodobny)	Mechanizmy obronne	0.776	0.435	1	1
115	Aktiwaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	*	0.172	*	1
116	Aktiwaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	0.381	-0.040	1	0
117	Syntaza 5-adenozylometioninowa	Metabolizm azotu	*	*	*	*
118	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	-0.201	0.237	0	0
119	Niezidentyfikowane	Niezna	0.092	-0.131	0	0
120	Niezidentyfikowane	Niezna	0.329	-0.081	1	0
121	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.241	0.057	0	0
122	Niezidentyfikowane	Niezna	0.055	0.343	0	1
123	S-transferaza glutationu	Mechanizmy obronne	*	*	*	*
124	Nieorganiczna pirofosfataza	Inne	0.357	0.327	1	1
125	Peroooksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	*	0.478	*	1
126	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	-0.052	-0.456	0	-1
127	Niezidentyfikowane	Niezna	0.827	0.121	1	0
128	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	-0.354	0.005	-1	0
129	Kinaza z nieaktywnym receptorem	Przekazywanie sygnałów	*	*	*	*
130	Cyklina H1	Regulacja cyklu komórkowego	0.508	0.300	1	1
131	Translokaza secA, chloroplastowa	Transport białek	0.049	-0.675	0	-1
132	Niezidentyfikowane	Inne	-0.107	0.460	0	1
133	Tubulina, łącuch beta-2	Białko strukturalne	0.331	-0.749	0	-1
134	Białko rybosomalne z rodziny L10	Ekspresja genów	-0.102	0.069	0	0
135	Peroksydoreduktaza dwu-cysteinowa (fragment)	Mechanizmy obronne	-0.393	-0.554	0	-1
136	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.346	0.189	-1	0
137	Niezidentyfikowane	Niezna	0.448	0.129	1	0
138	Lipokalina indukowana temperaturą	Mechanizmy obronne	*	-0.010	*	0
139	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	0.853	-0.015	0	0
140	Białko błony wewnętrznej chloroplastu HSP70	Transport jonów/elektronów	-0.032	0.299	0	1
141	Białko szoku cieplnego 70 kDa	Mechanizmy obronne	0.085	-0.025	0	0
142	Niezidentyfikowane	Niezna	*	-0.348	*	0
143	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.496	0.333	-1	1
144	Nieorganiczna pirofosfataza	Inne	0.157	0.291	0	0
145	Niezidentyfikowane	Niezna	0.121	-0.031	0	0
146	Apocytochrom f	Fotosynteza	*	*	*	*
147	Niezidentyfikowane	Niezna	0.034	0.080	0	0
148	Białko zaangażowane w biogenezę fotosystemu II	Fotosynteza	0.147	0.154	0	1
149	Syntaza cysteinowa	Metabolizm azotu	-0.010	0.168	0	0
150	Reduktaza ferredoksyna-azoty	Metabolizm azotu	-0.141	-0.474	0	-1
151	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.111	0.280	0	1
152	Dehydrogenaza fosfoglukonianowa	Metabolizm węgla	-0.039	0.076	0	0
153	Niezidentyfikowane	Niezna	0.073	0.316	0	1
154	Aminotransferaza	Metabolizm azotu	-0.276	0.023	-1	0
155	Niezidentyfikowane	Niezna	0.535	0.277	1	1
156	Syntaza ATP, podjednostka beta, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	-0.124	-0.085	0	0
157	Oksydoreduktaza NADP+:ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	-0.035	0.133	0	1
158	Translacyjnie kontrolowane białko nowotworu (homolog)	Mechanizmy obronne	-0.372	-1.131	-1	-1
159	Syntetaza alanilo-tRNA	Ekspresja genów	*	*	*	*
160	Tioreduktaza	Mechanizmy obronne	-0.573	0.051	-1	0
161	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	*	*	*	*
162	Peroksydoreduktaza dwu-cysteinowa	Mechanizmy obronne	0.017	-1.025	0	-1
163	Białko odporności na choroby At5g45440 (prawdopodobne)	Mechanizmy obronne	*	-0.051	*	-1
164	Białko zawierające domenę wiążącą RNA	Ekspresja genów	0.360	-1.777	1	-1
165	Izomeraza triozofosforanowa	Fotosynteza	*	0.336	*	0
166	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.396	-0.110	1	0
167	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	*	0.121	*	0
168	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.077	0.194	0	0
169	Peroksydoreduktaza dwu-cysteinowa	Mechanizmy obronne	-0.444	-0.311	0	0
170	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego A, chloroplastowa	Metabolizm węgla	0.212	-0.738	0	-1
171	RuBisCO, mała podjednostka (fragment)	Fotosynteza	0.007	0.015	0	0
172	Oksydoreduktaza NADP+:ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	0.072	0.152	1	1
173	Białko związane z patogenezą	Mechanizmy obronne	0.413	0.142	1	0
174	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
175	Syntaza ATP, podjednostka alfa, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	-0.220	0.020	-1	0
176	Oksydoreduktaza NADP+:ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	-0.073	-0.084	0	0
177	Aktiwaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	*	*	*	*
178	Fosforybulokinaza, chloroplastowa	Fotosynteza	-0.476	-0.700	-1	-1
179	Białko związane z wysychaniem PCC27-45	Mechanizmy obronne	0.445	0.278	1	0
180	Niezidentyfikowane	Niezna	0.002	0.063	0	0
181	Tubulina, łącuch beta-2	Białko strukturalne	*	*	*	*
182	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
183	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
184	RuBisCO, duża podjednostka (fragment)	Fotosynteza	0.027	0.706	0	0
185	RuBisCO, mała podjednostka (fragment)	Fotosynteza	*	*	*	*
186	Niezidentyfikowane	Niezna	0.092	0.390	0	1
187	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	*	0.192	*	0
188	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	1.604	0.079	1	0
189	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
190	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka alfa	Fotosynteza	0.117	1.730	0	1
191	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 2	Fotosynteza	*	*	*	*
192	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	0.051	0.183	0	1
193	Syntaza metioninowa	Metabolizm azotu	*	*	*	*
194	Lipokalina indukowana temperaturą	Mechanizmy obronne	0.480	0.302	1	1
195	Białko kompleksu rozkładającego wodę fotosystemu II 1	Fotosynteza	-0.232	0.217	0	0
196	Anhidraza węglanowa	Metabolizm węgla	0.210	-0.026	0	0
197	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.098	0.153	0	0
198	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
199	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
200	Metaloproteaza cynkowa zależna od ATP	Mechanizmy obronne	0.280	-1.176	0	-1
201	C-końcowa hydrolaza ubikwityny	Mechanizmy obronne	-1.135	0.507	-1	1
202	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
203	Syntaza ATP, podjednostka gamma, mitochondrialna	Transport jonów/elektronów	0.036	-0.556	0	-1
204	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.036	0.337	0	1
205	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.038	0.051	0	0
206	Niezidentyfikowane	Niezna	*	*	*	*
207	Białko rybosomalne z rodziny L2	Ekspresja genów	0.113	-0.250	0	0
208	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.160	-0.148	0	0
209	Niezidentyfikowane	Niezna	-0.083	-0.066	0	0
210	Białko rybosomalne 50S	Ekspresja genów	*	-0.748	*	0
211	Syntaza 5-adenozylometioninowa 3	Metabolizm azotu	*	*	*	*
212	Peroooksydaza askrobinianowa	Mechanizmy obronne	0.069	-0.150	0	0

213	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	*	*	*	*
214	Białko wiążące dużą podjednostkę RuBisCO, podjednostka alfa	Fotosynteza	-0.416	-0.654	0	-1
215	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
216	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
217	Niezidentyfikowane	Nieznana	-0.106	-0.241	0	0
218	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	*	0.329	*	1
219	Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna	Metabolizm węgla	-0.474	-0.389	-1	-1
220	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	-0.209	-0.024	-1	0
221	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
222	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	-0.566	*	-1
223	Niezidentyfikowane	Mechanizmy obronne	0.140	0.388	0	1
224	Niezidentyfikowane	Nieznana	-0.163	0.246	0	0
225	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.059	-0.103	0	0
226	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego B, chloroplastowa	Metabolizm węgla	-0.137	0.388	0	1
227	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.468	0.646	1	1
228	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	-0.069	*	0
229	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	0.007	*	0
230	Reduktaza glutationowa	Mechanizmy obronne	-0.300	-0.022	-1	0
231	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.494	-0.450	1	-1
232	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.031	0.128	0	0
233	Aktywaza RuBisCO, izoforma B	Fotosynteza	-0.066	0.758	0	1
234	Niezidentyfikowane	Nieznana	-1.187	-1.157	-1	-1
235	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	-0.215	*	-1
236	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
237	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
238	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.054	0.233	0	1
239	Dehydrogenaza mannitolu (prawdopodobna)	Metabolizm węgla	0.349	-0.110	0	0
240	RuBisCO, duża podjednostka	Fotosynteza	-0.414	0.542	-1	1
241	Syntetaza glutaminowa, chloroplastowa	Metabolizm azotu	*	0.320	*	1
242	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.023	0.177	0	1
243	Białko zawierające domenę W40	Multiple	-0.234	-0.113	-1	0
244	Niezidentyfikowane	Nieznana	-0.562	-0.440	-1	-1
245	Białko z motywem "F-box"	Przekazywanie sygnałów	0.364	0.242	0	0
246	RuBisCO, mała podjednostka	Fotosynteza	-0.018	-0.665	0	-1
247	Syntaza ATP, podjednostka alfa, chloroplastowa	Transport jonów/elektronów	-0.025	0.094	0	0
248	Oksydoreduktaza NADP ⁺ -ferredoksyna, chloroplastowe	Fotosynteza	-0.223	-0.010	-1	*
249	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
250	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.155	0.093	0	0
251	Niezidentyfikowane	Nieznana	*	*	*	*
252	Aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu	Metabolizm węgla	*	-0.330	*	0
253	Niezidentyfikowane	Nieznana	0.401	0.236	1	0
254	Aktywaza RuBisCO, izoforma A	Fotosynteza	-0.014	0.314	0	1
255	Sedoheptulozo-1,7-bisfosfataza	Fotosynteza	*	*	*	*
256	Epimeraza cukru nukleozydo-difosforanowego	Metabolizm węgla	*	*	*	*
257	Niezidentyfikowane	Nieznana	-0.169	0.652	-1	1