
MAIZE GERMINATION: A PROTEOMIC ANALYSIS

Pavelková R., Černý M., Brzobohatý B.

Laboratory of Molecular Plant Biology, CEITEC MENDELU, Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: r.pavelkova@seznam.cz

ABSTRACT

Germination of seeds is a complex physiological process which has a tremendous effect on plant growth and development. It is triggered by several stimuli, including imbibition of water. However, exact molecular mechanisms on proteome level are still to be elucidated. The role of light stimulus and the effect of imbibition (24 h) and early germination (48 h) on *Zea mays* seeds proteome was investigated by 2D gel analysis. In proteome maps, significant differences were reproducibly observed for 49 and 35 protein spots in light and dark cultivated seeds, respectively. Further, it was found that absence of light stimulus is not manifested during imbibition, but has a negative effect on number of responsive proteins in the second phase of germination.

Key words: Proteomics, seed germination, 2D electrophoresis

Acknowledgement: This work was supported by grants IAA600040701, LC06034, 1M06030, GAČR 206/09/2062, AV0Z50040507, AV0Z50040702, AV0Z40310501, JCMM grant „Podpora nadaných studentů v rámci Středoškolské odborné činnosti (SŮČ)“, and project CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

ÚVOD

Klíčení rostlin je jedním z tajů přírody, které fascinují lidstvo již odnepaměti. Znamená nejen nový život pro rostlinu, ale především u plodin využitelných v zemědělství i období, které má významný podíl na výsledném výtěžku. Schopnost urychlit či synchronizovat klíčení by zřejmě umožnila pěstování některých druhů rostlin i v oblastech, kde běžné vegetační podmínky jejich hospodárný růst neumožňují, či dosáhnout více reprodukčních cyklů během jedné sezóny. Procesy, kterými semínko během jednotlivých fází klíčení prochází, jsou proto intenzivně studovány řadu let, mezi jinými se otázkou klíčení zabýval již Charles Darwin (Darwin, 1855). Moderní metody jsou velkým přínosem při objasňování molekulární podstaty biologických procesů a mnohé je již známo i o klíčení (Weitbrecht a spol., 2011). Především proteomické přístupy se jeví jako velmi užitečné, protože narozdíl od genomických metod umožňují sledovat aktuální stav organismu včetně změn, které se odehrávají pouze na úrovni post-translačních modifikací.

MATERIÁL A METODIKA

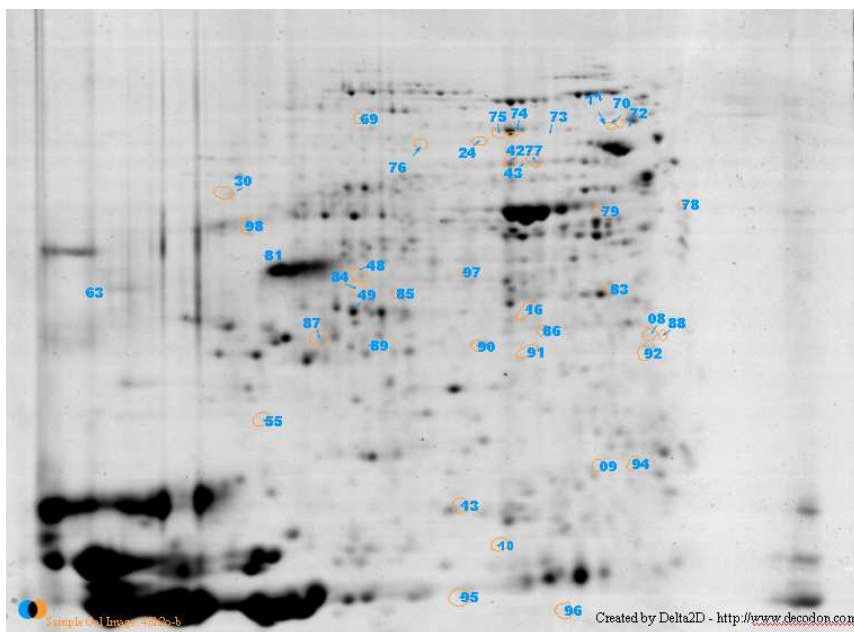
V experimentu bylo použito obilke kukuřice seté (*Zea mays*, kultivar CELUX, Čejč ČR). Obilky byly vysterilizovány [5 min 70% (V/V) ethanol v ddH₂O, 5 min 30% (V/V) roztok Sava v ddH₂O, 10× promytí ddH₂O, 2 min 70% (V/V) ethanol v ddH₂O], vysety na filtrační papír v Petriho misce 12×12 cm, převrstveny 10 ml ddH₂O pro stimulaci imbibice a následně kultivovány v kultivačním boxu Percival s následujícími parametry: (i) 25 °C, kontinuální světlo o intenzitě 100 μmol min⁻¹ m⁻² a (ii) 25 °C, kontinuální tma 0 μmol min⁻¹ m⁻² (pro zajištění absence světla byly misky navíc obaleny alobalem). Materiál byl sbírán po 24 a 48 h kultivace a ihned zamražen v tekutém dusíku. Pro analýzu proteomu byla zvolena izolace celkového proteinu pomocí běžné aceton/TCA (kyselina trichloroctová) extrakce. Obilky byly nejprve homogenizovány mlýnem v tekutém dusíku a poté zpracovány způsobem popsaným např. v Černý a spol. (2011). Získaný protein byl pak rozdělen pomocí 2D elektroforézy (Bio-Rad), rozdělené proteiny byly vizualizovány pomocí koloidní Coomassie, digitalizovány pomocí kalibrovaného denzitometru (GS-800, Bio-Rad) a analyzovány softwarem Decodon 3.6 Delta2D (<http://www.decodon.com>). Spoty signifikantně regulované ve dvou opakováních (P<0.05, změna v relativním objemu >50 %) byly dále vyhodnoceny pomocí shlukové analýzy (Cluster 3.0, Java TreeView), vyřezány a připraveny pro identifikaci proteinu metodou MALDI MS.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vedle teploty a světelné kvality je zřejmě nejvýznamnější stimulus spouštějící klíčení rostlin imbibice. Experimenty s modelovou rostlinou *Arabidopsis thaliana* ukázaly, že nová syntéza proteinů je zahájena již v průběhu prvních 8 hodin imbibice a maxima dosahuje mezi 16 a 24 hodinami (Rajjou a spol, 2006). Nicméně značná část proteomu je během této doby stále tvořena

zásobními proteiny uloženými během dozrávání, což je patrné i na Obr. 1. Cílem této práce bylo porovnat změny proteomu způsobené imbibicí (24 h) a dále průběh klíčení (48 h) kukuřice kultivované při kontinuálním osvětlení a ve tmě. Mapa proteomu obilky kukuřice ukázala průměrně 664 rozdělených proteinových spotů v rozsahu molekulové hmotnosti 10-250 kDa a pI 3-10 (Obr. 1).

Obr. 1 Mapa proteomu obilky kukuřice s vyznačenými proteiny regulovanými v průběhu prvních 48 h klíčení



Celkově bylo nalezeno 49 signifikantně regulovaných spotů v experimentu s kontinuálním osvětlením a 35 v absenci světla ($P < 0,05$; 2 biologická opakování) (Obr. 1, Tab. 1). Bližší porovnání obou sad ukázalo, že první fáze (imbibice) vykazuje u řady proteinů podobný účinek na jejich regulaci a zřejmě se tedy tyto děje spouští pouhým pronikáním vody do obilky. Oproti tomu porovnání proteomu po 48 hodinách ukazuje markantní rozdíl v rostlinách klíčících v absenci světelného stimulu, kde evidentně dochází k utlumení účinků imbibice (Tab. 1).

Tab. 1 Rozdělení signifikantně regulovaných proteinových spotů v průběhu klíčení kukuřice

	24 h		48 h	
<i>Osvětlení</i> [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$]	<i>Snížení množství proteinu</i>	<i>Nárůst množství proteinu</i>	<i>Snížení množství proteinu</i>	<i>Nárůst množství proteinu</i>
100	33	4	35	11
0	25	4	9	10

ZÁVĚR

Podarilo se získat náhled proteomu klíčící kukuřice. Experimenty ukázaly, že proteom výrazně reaguje na přítomnost/absenci světelného stimulu v průběhu 2. fáze klíčení. Práce poskytla řadu cenných informací, které poslouží jako základ dalších detailních studií.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektů: IAA600040701, LC06034, 1M06030, GAČR 206/09/2062, AV0Z50040507, AV0Z50040702, AV0Z40310501 a podpory JCMM „Podpora nadaných studentů v rámci Středoškolské odborné činnosti (SOČ)“ a ERDF projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

LITERATURA

Černý M, Dyčka F, Bobál'ová J, Brzobohatý B (2011): Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. *Journal of Experimental Botany*, 62, 921-937.

Darwin CR (1855): Effect of salt-water on the germination of seeds. *Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette*, 47, 773.

Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D. (2006): Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, 141, 910–923.

Weitbrecht K, Muller K, Leubner-Metzger G (2011): First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3289-3309.