

UDK: 577.112:630*

Pregledni rad *Review paper*

MOLEKULARNI MEHANIZMI ODGOVORA DRVENASTIH VRSTA BILJAKA NA ABIOTIČKI STRES

Trudić Branislav¹, Radović Svetlana², Galović Vladislava¹, Jovanović Živko³,
Stanisavljević Nemanja³

Izvod: Sve učestalije i intenzivnije promene faktora spoljašnje sredine deluju na biljke kao stres. suočene sa ovim promenama biljke su razvile mehanizme tolerancije i adaptacije, koji im omogućavaju opstanak. Ovi mehanizmi funkcionišu na morfološkom, fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou, međusobno su povezani, regulisani i usklađeni u integrisani sistem odgovora na promene u životnoj sredini. Mnogi ključni regulatorni i funkcionalni molekuli koji učestvuju u odgovoru na abiotički stres su identifikovani i time je otvorena mogućnost primene novih strategija u upravljanju stresom. Tema ovog rada su molekularni i biohemijski mehanizmi odgovora drvenastih vrsta biljaka na različite tipove abiotičkog stresa, sa posebnim osvrtom na topole.

Ključne reči: abiotički stres, antioksidativni sistemi, male RNK, topola, transkripcioni faktori

MOLECULAR MECHANISMS OF WOODY PLANT SPECIES ABIOTIC STRESS RESPONSE

Abstract: *More frequent and more intense changes in environmental factors act as a stress on the plants. Faced with these changes, plants have developed mechanisms of tolerance and adaptation, which enable them to survive. These mechanisms operate on the morphological, physiological, biochemical and molecular level, are interconnected, regulated and coordinated in an integrated system response to changes in the environment. Many key*

¹Branislav Trudić, MSc, istraživač-pripravnik, dr Vladislava Galović, naučni saradnik, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Univerzitet u Novom Sadu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Srbija, btrudic@uns.ac.rs

²prof. dr Svetlana Radović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Studentski trg 16, Beograd

³Živko Jovanović, istraživač-saradnik, Nemanja Stanisavljević, istraživač-saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Vojvode Stepe 444a, Beograd

regulatory and functional molecules involved in the response to abiotic stress are identified, thus opening the possibility for implementation of new strategies in the stress management. This paper outlines the molecular and biochemical mechanisms of response of woody plants to different types of abiotic stress, with special emphasis on poplars.

Key words: *abiotic stress, antioxidative systems, small RNA, poplar, transcription factors*

UVOD

Promene spoljašnje sredine, posebno u uslovima globalnih klimatskih promena, mogu delovati na živi svet kao stres. Najvažniji faktori spoljašnje sredine koji mogu predstavljati abiotički stres za biljke su nedostatak vode (suša), toplota, hladnoća, višak soli u zemljištu, teški metali (Galović et al., 2012a, 2012b), UV zračenje, povećana koncentracija CO₂, a za drvenaste biljke i vetar kao oblik mehaničkog stresa. Hipoksija je takođe važan abiotički stres koji može da ima značajne posledice, a posebno je bitan kod topola. Osim delovanja pojedinačnih nepovoljnih faktora, biljke se suočavaju sa združenim delovanjem više faktora, kao što su suša i toplota, zaslanjenost zemljišta i povećanje temperature (multipli stresovi). Abiotički stresovi su značajni uzroci gubitaka poljoprivredne proizvodnje i prirodne vegetacije, jer uzrokuju mnogobrojne morfološke, fiziološke, biohemijske i molekularne promene koje utiču na rast biljaka i produktivnost. Poznavanje i "upravljanje" abiotičkim stresom je posebno važno za dugoročni rast i opstanak drvenastih vrsta biljaka. Prilagođavanje biljaka na stresove iz spoljašnje sredine posredovana je i usaglašena nizom vrlo složenih signalnih puteva. Stres-osetljivi mehanizmi regulišu različite ćelijske i molekularne događaje u biljkama i ekspresiju različitih stres-tolerantnih gena. Nedavno je napravljen veliki napredak u proučavanju ove složene kaskade molekula i gena u abiotičkim i biotičkim stresnim reakcijama (Osakabe et al., 2011).

Višegodišnje drvenaste biljke su najkompleksnija i najkrupnija drvenasta forma biljaka. Ovakve životne forme ulažu najveću količinu produkovanih asimilata u provodno i mehaničko tkivo i na taj način ostvaruju specifičnu građu nadzemnih organa i omogućavaju adekvatan promet vode od podzemnih do nadzemnih struktura i kroz njih. Stabla ovih biljaka su često veoma razgranata, visoka i debela, ponekad izuzetnih i neobičnih dimenzija (Krstić et al., 2011).

Glavna karakteristika drvenaste forme biljaka je više-manje čvrsto stablo, omogućeno stvaranjem sekundarnog ćelijskog zida između biljnih ćelija. U ovakvom ćelijskom zidu nalaze se mnogobrojne paralelne niti celuloze, povezane molekulima hemiceluloze i pektina. Dodatnu čvrstinu zidu daju polifenolne supstance tipa lignina (grč. *lignos*-drvo). Sve biljke sa drvenastim stablom nisu drveće (Krstić et al., 2011).

Vrste roda *Populus* odabrane su kao model za istraživanja drvenastih vrsta u molekularnoj biologiji i biohemiji zbog svojih karakteristika kao što su brzi rast, relativno mali genom, razvijeni eksperimentalni protokoli za transformaciju i regeneraciju *in vitro*, postojanje fizičkih i genetičkih mapa (Trudić et al., 2012).

Navedene karakteristike omogućavaju primenu savremenih metoda molekularne biologije za istraživanja fundamentalnih procesa koji su ključni za rast, razviće, odgovor na stres i produktivnost drvenastih vrsta, uključujući i primenu tehnologije rekombinantne DNK (genetičkog inženjerstva).

Prvi sekvencirani genom jedne drvenaste vrste je genom *Populus trichocarpa*. Ova vrsta ima kompaktni genom od oko 500 Mbp organizovan u 19 hromozoma (Tuskan et al., 2006; Galović i Orlović, 2007). Ovaj genom je oko 50 puta manji od genoma bora, a oko 4 puta veći od genoma *Arabidopsis thaliana*, najznačajnijeg model organizma u molekularnoj biologiji biljaka. Iako drvenaste vrste imaju svoje specifičnosti, fundamentalni mehanizmi razvića i odgovora na abiotičke faktore zajednički su za sve biljne vrste.

REGULATORI ODGOVORA DRVENASTIH VRSTA BILJAKA NA ABIOTIČKI STRES

U odgovor biljaka na stres uključeni su brojni molekularni putevi i sistemi, između kojih postoje interakcije i uzajamna delovanja. Ovi složeni putevi čine kompleksnu mrežu regulatora od percepcije stresa, preko signalnih puteva, do odgovora u vidu ekspresije odgovarajućih gena, što može rezultovati pojavom tolerancije i aklimatizacije. Iako su ključni mehanizmi odgovora na stres zajednički za sve biljke, postoje specifičnosti pojedinačnih biljaka koje uslovljavaju i specifičnosti u reakciji na stres.

Informacije o sensorima abiotičkog stresa kod biljaka su veoma ograničene. Pokazano je kod arabidopsisa da AHK1/ATK1 membranska histidin kinaza može funkcionisati kao osmosenzor (Tran et al., 2007). Ključnu ulogu u toleranciji na soli i održavanju niske koncentracije Na^+ i homeostaze jona u ćeliji ima SOS signalni put (Salt Overly Sensitive pathway), najpre okarakterisan kod arabidopsisa. Ovaj signalni put ima tri osnovne komponente: SOS1 (Na^+/H^+ izmenjivač-antiport), SOS2 (protein kinaza) i SOS3 (protein koji vezuje kalcijum). Povećanje koncentracije Na^+ u ćeliji dovodi do povećanja koncentracije Ca^{2+} koji se vezuje za SOS3, a SOS3 se potom vezuje za SOS2 i aktivira ga, tako da kompleks SOS3/SOS2 fosforiliše i aktivira SOS1 na membrani. Nedavno je pretpostavljeno da SOS1 može biti novi senzor za Na^+ (Fujii and Zhu, 2009). Komponente SOS signalnog puta okarakterisane su i kod *Populus trichocarpa* (PtSOS1, PtSOS2 i PtSOS3) i pokazano je da postoji funkcionalna konzerviranost ovog puta kod zeljastih i drvenastih vrsta (Tang, 2010). Takođe je pokazano da i MAP kinazna kaskada učestvuje u prenosu signala zasljenosti i hladnoće (Teige et al., 2004), a SNF1 kinaze –sucrose non-fermentation 1- (SnRK1, 2 i 3) u prenosu signala osmotskog stresa i apscisinske kiseline (u daljem tekstu: ABA).

Signalni molekuli, kao što su inozitol trifosfat (IP3), diacilglicerol, inozitol heksafosfat i ROS-ovi (eng. Reactive Oxigen Species) mogu dovesti do povećanja koncentracije Ca^{2+} , koji je veoma važan sekundarni glasnik u ćeliji. Abiotički i biotički stres dovode do produkcije ROS-ova, čija povećana koncentracija takođe predstavlja oblik stresa (oksidativni stres). Jedan od najranijih signala mnogih

abiotičkih stresova upravo su reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne vrste azota (RNS), koji mogu modifikovati aktivnost enzima i regulisati ekspresiju gena, pa se smatraju veoma važnim sekundarnim glasnicima u prenosu signala stresa (Jammes et al., 2009). ROS-ovi kao signali stupaju u interakciju sa signalima hormona (Mittler et al., 2011). Potvrđena je i uloga ROS-ova u prenosu signala osmotskog stresa kod topole (Xiao et al., 2009). Mreža signalnih molekula i prenosilaca signala treba da omogući adekvatnu ekspresiju gena, kao uslov za uspešan odgovor na stres.

Transkripcioni faktori i odgovor na stres

Nakon detekcije abiotičkog stresa jedan od načina reagovanja biljke na njega je promena u ekspresiji odgovarajućih gena. Produkti aktivnosti ovih gena mogu se podeliti na dve grupe (Shinozaki et al., 2003): prvu grupu čine regulatori ekspresije gena i signalnih puteva (protein kinaze, fosfataze, transkripcioni faktori, enzimi metabolizma fosfolipida), a drugu funkcionalni molekuli koji su direktno uključeni u tolerantnost na stres kao što su različiti antioksidanti, šaperoni, osmoprotektanti itd.

Proučavanja transkripcione regulacije dehidracije i zaslanjenosti dovela su do otkrića tzv. ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Dehidracija ćelije u uslovima ograničenog priliva vode, dovodi do povećanja endogenog sadržaja ABA u ćeliji, što uslovljava ekspresiju ciljnih gena koji kodiraju transkripcione faktore, signalne komponente, enzime i dr. (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Geni koji odgovaraju na ABA, uglavnom su regulisani transkripcionim faktorima tipa bZIP (AREB/ABF), koji se vezuju za ABRE *cis*-elemente u promotorima (Fujita et al, 2005). Kod ABA-nezavisnog puta ciljni geni imaju u promotorima *cis*-sekvencu DRE/CRT za koju se vezuju transkripcioni faktori ERF/AP2 tipa, kao što su familije DREB1/CBF i DREB2. DREB1 tip transkripcionih faktora je uključen u odgovor na niske temperature, a DREB2 u odgovor na dehidraciju i povišenu temperaturu u spoljašnjoj sredini (Maruyama et al., 2004; Sakuma et al., 2006). DREB transkripcioni faktori izolovani su, osim kod arabidopsisa, i kod mnogih drugih biljnih vrsta i okarakterisana je njihova ekspresija. Tako je kod graška pokazano da ekspresiju gena *DREB2A* indukuju suša, soli, ali i ABA nakon dužeg perioda delovanja (Jovanović et al., 2011a), što uz radove drugih autora na nekim drugim biljnim vrstama ukazuje na moguću interakciju ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta. Nedavno je izolovan tip DREB2 transkripcionog faktora, nazvan PeDREB2, iz *Populus euphratica* (Chen et al., 2009). Ekspresija gena za ovaj transkripcioni faktor *PeDREB2* u transgenom duvanu popravljala tolerantnost na soli. Takođe je pokazano da geni *EgucBF* iz *Eucalyptus gunii* popravljaju tolerantnost na mraz kod transgenih linija (Navarro et al., 2011). Transkripcioni faktor DREB1C uključen je u ekspresiju gena koji odgovaraju na stres suše, soli i niske temperature. Ovaj gen, fuzionisan sa promotorom gena *rd29A* arabidopsisa (ovaj gen se indukuje abiotičkim stresovima i pod kontrolom je DREB transkripcionih faktora) ubačen je u

genom *Populus x euramericana* cv. Nanlin895, čime je dobijena transformisana topola otporna na sušu i soli, bez štetnih posledica na rast biljke (Yang et al., 2009). Ovim je pokazana mogućnost primene gena za transkripcione faktore DREB familija za dobijanje transgenih topola otpornih na abiotičke stresove.

Uz navedene transkripcione faktore i mnogi drugi su uključeni u regulaciju gena koji se eksprimiraju pod uticajem abiotičkog stresa. Kod *Populus*-a su okarakterisani transkripcioni faktori DREB2A, DREB2B, MYB, koji se indukuju osmotskim stresom, AREB1/ABF2, koji se indukuju apscisinskom kiselinom i NAC, koji se indukuje sušom, solima i apscisinskom kiselinom. Pokazano je da inducibilna ekspresija DREB2A i MYB transkripcionih faktora i konstitutivna ekspresija AREB/ABF2 pozitivno utiču na toleranciju *Populus deltoides* prema suši, bez štetnih posledica na rast i prinos biomase (Campbell, 2010). Transkripcioni faktori zapravo čine mrežu čija sinhronizovana i fino regulisana aktivnost formira transkripcionu kaskadu koja dovodi do adekvatnog odgovora na promene spoljašnje sredine. Tako je ekspresija gena *DREB1A/CBF3* regulisana na transkripcionom nivou transkripcionim faktorom tipa MYC (ICE1 - INDUCER OF CBF EXPRESSION 1), a ekspresija *DREB1C/CBF2* regulisana je transkripcionim faktorom CAMTA (calmodulin binding transcription activator), čime se uspostavlja veza sa signalnim putevima kalcijuma. ZAT12 transkripcioni faktor (pripada grupi proteina sa „cinkanim prstima“ – zinc finger protein) takođe je uključen u regulaciju ekspresije *DREB/CBF* gena (Hirayama i Shinozaki, 2010). Osmotski stres dovodi do *de novo* sinteze transkripcionih faktora MYB i MYC, koji zajedno indukuju ekspresiju gena čiji su produkti direktno uključeni u odgovor na stres.

Neki od transkripcionih faktora koji su uključeni u odgovor na stres regulisani su na posttranslacionom nivou putem posttranslacionih modifikacija i obično su uključeni u brze i rane odgovore na stres. Od posttranslacionih modifikacija najzastupljenije su fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija. Transkripcioni faktori ABI5 i AREB/ABF koji odgovaraju na prisustvo ABA, regulisani su fosforilacijom serina i treonina pomoću odgovarajućih protein kinaza (Kobayashi et al., 2005). DREB2 transkripcioni faktori regulisani su ubikvitinacijom pomoću DRIP1 i DRIP2 E3 ligaza, što dovodi do proteolitičke razgradnje ovih transkripcionih faktora pomoću 26S proteazoma (Qin et al., 2008). Osim transkripcionih faktora, abiotički stres, kao što je zaslanjenost, dovodi do povećanja ubikvitinacije i drugih proteina, kao i do povećanja ekspresije samog ubikvitina (Jovanović et al., 2011b). Nasuprot ubikvitinaciji, sumoilacija dovodi do aktiviranja transkripcionih faktora: pokazano je da sumoilacija transkripcionog faktora ICE1 pomoću SUMO E3 ligaze, dovodi do aktiviranja DREB1A/CBF3 transkripcionog faktora (Miura et al., 2007).

AtTZF1 pripada *Arabidopsis Tandem CCCH Zinc Finger* familiji gena sa sledećim motivom- Cx7-8Cx5Cx3H-x16-Cx5Cx4Cx3H i ovaj transkripcioni faktor može da se veže za DNK i RNK u *in vitro* uslovima i da se kreće između jedra i određenih regiona u citoplazmi. Smatra se da je njegova uloga ključna u mehanizmima otpornosti različitih biljnih vrsta prema suši i drugim abiotičkim stresovima. Da bi se uopšte utvrdilo da li AtTZF1 utiče na ekspresiju gena na

različitim nivoima, naučnici su prvo ispitali da li AtTZF1 pokazuje ikakvu aktivnost transkripcionog faktora, vezivajući se za neki DNK region u protoplastnom sistemu kvasca i kukuruza. AtTZF1 fuzionirani proteini nisu mogli da pokažu očekivanu transkripcionu aktivnost u tranzijentnom ekspresionom sistemu protoplasta kukuruza. Ovakav rezultat bi mogao jednostavno da se bazira na slabom prisustvu AtTZF1 fuzioniranih proteina u jedru tokom sprovođenja samog eseja (Wang et al., 2008).

Rezultati dobijeni iz delecione analize AtTZF1 gena su otkrili postojanje višestrukih *signala za izlaz iz jedra* (eng. Nuclear Exit Signals (NESs)), predstavljajući izazov u daljoj mutacionoj manipulaciji ovih mesta bez većih rizika po (mogućoj) funkciju AtTZF1 u jedru. U cilju lokalizovanja i targetovanja veće količine AtTZF1 u jedru, farmakološki pristup tretiranja protoplasta sa inhibitorom jedarnog eksporta-leptomycin-a B (LepB) je uveden u dalje analize. Posle primene LepB, većina GFP-GAL4-AtTZF1 proteina je postalo "zarobljeno" u jedru i time dalo osnovu za dalja istraživanja njegove tačne funkcije u ćeliji tj. jedru (Lin et al., 2011).

Različiti nivoi ekspresije nekoliko klastera ko-ekspimiranih gena za metabolizam ABA (abscisinske kiseline) i GA (giberelinske kiseline) su isto tako identifikovani u AtTZF1 over-ekspresionim sistemima (OE). Ovo sugeriše da bi AtTZF1 mogao uticati na ABA i GA akumulaciju u izvesnim biljnim organima u ključnim stadijumima biljnog života. Merenja koncentracije hormona nisu pokazali značajne razlike u nivoima ABA i GA između divljeg tipa i biljaka koje su pokazale overekspresiju AtTZF1 i ovo bi moglo da ukáže da AtTZF1 u stvari ima direktan efekat na fiziološki odgovor ova dva hormona u biljci (Wang et al., 2008).

Uloga malih RNK u odgovoru na stres

Male nekodirajuće RNK predstavljaju veoma važnu klasu regulatora ekspresije gena eukariota i učestvuju u procesima kao što su posttranskripciono utišavanje gena (PTGS – posttranscriptional gene silencing) i transkripciono utišavanje gena (TGS – transcriptional gene silencing). Fundamentalni procesi sinteze i funkcije malih nekodirajućih RNK zajednički su za sve eukariote, ali postoje i mnogi mehanizmi specifični za vrstu organizma. Na osnovu biogeneze, male RNK su podeljene na dve glavne klase: siRNK (short interfering RNA) i miRNK (micro RNA) (Mallory i Vaucheret, 2006). Prva klasa nastaje obradom dugačke dvolančane RNK, dok miRNK nastaje obradom jednolančanog primarnog transkripta gena za miRNK, nakon čega dobija karakterističnu sekundarnu strukturu „drška-petlja“ (double-stranded stem-loop). Kod biljaka, ove RNK, veličine 21 do 24 nt, uključene su u sve aspekte života, kao što su regulacija rasta, razvića, metabolizma, odgovor na abiotičke i biotičke stresove. Male RNK negativno regulišu ekspresiju ciljnih gena, tako što iniciraju degradaciju iRNK sa kojom imaju komplementarne sekvence. Degradacija specifične iRNK je dominantan mehanizam inhibicije ekspresije kod biljaka. Osim degradacije iRNK, inhibitorno dejstvo male

RNK ostvaruju i inhibicijom translacije, a ovaj mehanizam je kod biljaka zastupljen u manjoj meri. Najvažniji ciljni geni, čiju ekspresiju regulišu male RNK su geni za transkripcione faktore, komponente signalnih puteva i F-boks proteine.

Izolovan je veliki broj familija miRNK iz arabidopsisa, pirinča i drugih biljnih vrsta. Pored velikog broja zajedničkih, konzerviranih miRNK, postoje i familije specifične za vrstu. Ove specifične familije uglavnom su uključene u specifične procese razvića. Barakat et al., (2007) izolovali su male RNK iz listova i pupoljaka topole i tom prilikom, uz već poznate biljne miRNK, identifikovali i 48 novih miRNK koje su specifične za *Populus*. Potencijalni ciljni geni ovih *Populus*-specifičnih miRNK uključeni su u razviće i otpornost na stres. Lu et al., (2005, 2008a, 2008b) izolovali su miRNK iz *P. trichocarpa*, čija je ekspresija promenjena pod uticajem niskih temperatura, toplote, soli, dehidracije i mehaničkog stresa. Identifikovane su i miRNK topole koje se specifično ekspimiraju u odgovoru na UV-B zračenje (Jia et al., 2009a). Ove miRNK su konzervirane i zastupljene kod mnogih drugih biljnih vrsta, ne samo drvenastih, a takođe su uključene i u druge oblike stresa kod različitih biljnih vrsta. Ciljni geni ovih UV-B-specifičnih miRNK uključeni su u regulaciju energetskog metabolizma i produkciju ROS-ova. Jedna od najpoznatijih miRNK uključenih u odgovor na abiotički stres je miR398. Ova miRNK je konzervisana i zastupljena je kod arabidopsisa, pirinča, topole. Oksidativni stres kod arabidopsisa dovodi do smanjenja ekspresije i zastupljenosti miR398, što rezultuje povećanom ekspresijom ciljnih gena, kao što je gen za superoksid dismutazu, i povećanom otpornošću na stres. Interesantno je da ABA i soli indukuju ekspresiju miR398 kod topole (Jia et al., 2009b), što ukazuje na postojanje različitih signalnih mehanizama odgovora na stres kod zeljastih i drvenastih biljaka. Kod *Populus trichocarpa* u odgovoru na bakar identifikovane su konzervirane miR397, miR398 i miR408, ali i *Populus*-specifična miR1444, što govori o konzerviranosti i diverzitetu miRNK uključenih u odgovor na povećane koncentracije bakra (Lu et al., 2011).

Kao što je već rečeno, druga klasa malih RNK, siRNK, ne nastaje transkripcijom odgovarajućih gena kao miRNK, već predstavlja proizvod specifičnog procesa degradacije dvolančanih RNK. Abiotički stresovi dovode do akumulacije novih antisens-preklapajućih transkripata, kao i transkripata sa transpozona i pseudogena, kao izvora siRNK, što govori o ulozi ovih molekula u odgovoru na stres. Jedan od najilustrativnijih primera uloge nat-siRNK prikazan je u radu Borsani et al., (2005). Ova siRNK nastaje iz preklapajućih iRNK za $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat dehidrogenazu (*P5CDH*) i *SRO5* (*SIMILAR TO RCD ONE 5*) i reguliše ekspresiju gena *P5CDH* i *SRO5*. Stres soli indukuje ekspresiju *SRO5* i produkciju siRNK, koja utišava ekspresiju gena *P5CDH* i dovodi do akumulacije osmoprotektanta prolina. Prema do sada dostupnim podacima, izgleda da regulatorni sistem *P5CDH-SRO5* funkcioniše samo kod arabidopsisa, a ne i kod drugih biljnih vrsta.

Fitohormoni i odgovor na stres

U nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine (kao što su nedostatak vode, niske ili visoke temperature, visoke koncentracije soli i dr.), nivo apscisinske kiseline u biljkama se povećava. Smatra se da pad vodnog potencijala izaziva znatno povećanje propustljivosti membrana hloroplasta za ABA. Sintetisana i nagomilana ABA difunduje iz hloroplasta u citoplazmu mezofilnih ćelija i kreće se dalje kroz plazmodezme do ćelija zatvaračica, gde indukuje zatvaranje stoma (Krstić et al., 2011).

Do sada je u većem broju slučajeva utvrđena pozitivna korelacija između otpornosti biljaka prema suši i njihove sposobnosti za nakupljanje apscisinske kiseline. U novije vreme se ovom fitohormonu pridaje značajna pažnja pri selekciji biljaka na povećanu otpornost prema suši. ABA takođe ima značajnu ulogu u povećanju otpornosti prema niskim temperaturama kod biljaka, u zoni sa izraženim godišnjim dobima. Pozitivni efekti ABA na povećanje otpornosti prema izmrzavanju opisani su kod jabuke (*Pirus malus*) i javora (*Acer negundo*) (Krstić et al., 2011).

Receptori za ABA i komponente prenosa signala nedavno su identifikovani (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Osim ABA i drugi biljni hormoni imaju značajnu ulogu u koordinisanju odgovora na stresne faktore. To su pre svega hormoni etilen, jasmonska kiselina (JA) i salicilna kiselina (SA), za koje je pokazano da stupaju u interakciju sa signalnim putevima ABA. Etilen je uključen u odgovor na sušu, ozon, hipoksiju, toplotu, hladnoću, UV-B zračenje i povredu (Cramer et al., 2011). Poznata je interakcija između ABA i etilena u odgovoru na sušu (Yoo et al., 2009). Transkripcioni faktor MYC2 je tačka u kojoj se susreću signalni putevi ABA i JA, a ERF1 je tačka konvergencije puteva etilena i JA (Lorenzo i Solano, 2005). Aktuelna su istraživanja povezanosti i uključenosti i drugih hormona u integrisan odgovor biljke na abiotičke stresove, kao i povezanosti signalnih puteva hormona i malih RNK i povezanosti odgovora na abiotičke i biotičke stresove. Tako je pretpostavljena uloga MYB96 kao molekularne sprege između signala auksina i ABA, koja povezuje odgovor na sušu i formiranje bočnih korenova kod arabidopsisa, kao vid adaptivne strategije (Seo, 2009).

Antioksidativni sistemi zaštite kod biljaka

Oksidativna oštećenja kod biljaka nastaju kada kapacitet antioksidativne zaštite i detoksifikacioni mehanizmi postanu slabiji u odnosu na prooksidativne procese. Kod biljaka u odbrani od oksidativnog stresa su veoma bitni neenzimatski nisko-molekulski antioksidanti, poput askorbinske kiseline (Asc), glutationa (GSH), tiola, α -tokoferola i protektivni pigmenti kao što su karotenoidi (Rama et al., 1998; Inze et al., 1995; Tausz et al., 2003). Neenzimatski "skevinžeri" (hvatači) su esencijalni u ćelijskoj zaštiti od ROS-a, ali oni ne mogu da se u potpunosti izbore sa redukovanim oblicima kiseonika kao što su superoksid-radikal ili hidroperoksidi (Chaudiere i Ferrari-Iliou, 1999).

U toku evolucije kod živih organizama razvili su se mnogobrojni mehanizmi enzimske antioksidativne zaštite. Oni se mogu podeliti na:

- *Primarne* – reaguju direktno sa prooksidativnim vrstama (katalaza i superoksid dismutaza),
- *Sekundarne* – regenerišu molekule antioksidanata malih molekulskih masa (askorbat dehidrogenaza i glutation reduktaza).

Najvažniji antioksidativni enzimi su: superoksid-dizmutaza (SOD: EC 1.15.1.1), katalaza (CAT: EC. 1.11.1.6), askorbat peroksidaza (APx: EC 1.11.1.11), monodehidroaskorbat reduktaza (MDAR: EC. 1.1.5.4), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR: EC 1.8.5.1) i glutation-reduktaza (GR: EC 1.6.4.2).

Mehanizmi otpornosti drvenastih biljaka prema suši kao jednom od najvećih klimatskih faktora

Poikilohidrične biljke mogu podneti period suše tokom vegetacije smanjujući intenzitet rasta i svih fizioloških procesa na minimum, što je karakteristika mirovanja kod biljaka. Druge biljke, kao što su sukulente, temelje svoj način preživljavanja na sposobnosti tkiva da akumulira vlagu, pri čemu veliku ulogu ima vododržea sposobnost tkiva, morfološke promene nadzemnih delova u smislu smanjivanja gubitaka transpiracijom i razvoj korena u dubinu, prema slojevima tla s više vode. Fiziološki mehanizmi odbrane od isušivanja temelje se na povećanju koncentracije osmotski aktivnih jona i molekula, tzv. osmoprotektanata, koji sprečavaju dehidrataciju i denaturaciju proteina, odnosno održavaju koloidnu strukturu protoplazme. Kompatibilni osmoliti, dakle, održavaju ravnotežu vodnog potencijala unutar ćelije. Poznati molekuli koji pokazuju takvo delovanje su prolin, sorbitol, ektoin i glicin-betain, te tzv. LEA proteini, od kojih su najpoznatiji dehidrini (DHN). Dehidrini predstavljaju grupu II (D-11 familija) LEA proteina, koji se indukuju vodnim deficitom i karakterišu se prisustvom jednog ili više motiva bogatih lizinom. Dehidrini su najpre okarakterisani kod zeljastih biljaka (Close, 1997), a potom i kod drvenastih. Liu i saradnici (2012) sistematski su okarakterisali sve dehidrine i odgovarajuće gene kod *Populus trichocarpa*. Dokazana je sinteza navedenih molekula i pri drugačijim oblicima abiotičkog stresa, kao što je povećani salinitet u zemljištu. U novije vreme sve više dokaza upućuje na zaštitnu ulogu prolina u detoksifikaciji slobodnih kiseoničnih radikala koji se javljaju kod oksidativnog stresa. Zaštitna uloga šećera i kalijuma, koji povećavaju osmotsku vrednost protoplazme i time povećavaju sadržaj vezane vode, značajna je i u otpornosti biljaka prema promrzavanju.

Biohemijski aspekti otpornosti topola prema abiotičkom stresu

Topole (rod *Populus*) mogu akumulirati visoke koncentracije jona teških metala poput kadmijuma, nikla, cinka, bakra i olova u nadzemnim tkivima. Akumulacija jona kadmijuma u topolama je 30 puta veća u odnosu na druge drvenaste vrste, u čemu se ogleda njihova prednost u pošumljavanju izuzetno

zagađenih regiona (Katanić et al., 2006). Ove biljke poseduju efikasne mehanizme za premeštanje teških metala u nadzemna tkiva. Međutim, tačna lokalizacija teških metala, naročito cinka i kadmijuma u biljnim ćelijama još uvek je nepoznata u ovim vrstama (Migeon et al., 2010).

Bolu i Polle (2004) su analizirali hibride topole (*P. nigra x Alba*, INRA clon 717-1B4), dobijene mikropropagacijom, na oksidativni stres indukovani različitim koncentracijama NaCl. Došli su do zaključka da se, u uslovima visokog saliniteta, koncentracija MDA (malonil dialdehid, pokazatelj lipidne peroksidacije) počela povećavati u korenju nakon 7 dana izloženosti natrijum hloridu i bila je oko dva puta veća nego u kontrolama nakon tri nedelje. U niskim koncentracijama NaCl, u ispitivanim biljkama, aktivnost superoksid dismutaze (u daljem tekstu: SOD) se počela povećavati pred kraj eksperimenta. U visokim nivoima saliniteta, aktivnost SOD je odmah povećana, te povišen nivo bio stalan oko dve nedelje i pokazao rast nakon toga, što odgovara pojavi povećanja koncentracije malonildialdehida, degradaciji proteina i pojavi gubitka biomase. Međutim, vremenska zavisnost, tokom aktivnosti SOD u ovom istraživanju, pokazuje dve zasebne faze: prva faza je nagli porast SOD aktivnosti, kada oksidativna oštećenja nisu primetna, a druga faza je kada dolazi do povećanja MDA. Ti podaci pokazuju da, iako su korenovi u primarnom kontaktu sa NaCl, bolje se nose sa oksidativnim stresom nego izbojci.

Visoko i trajno antioksidativno delovanje tokom celog ispitivanog perioda zabeleženo je i u jedinkama vrste *Populus alba* L. U ovoj biljci dolazi do procesa intenziviranja lipidne peroksidacije i akumulacije slobodnog prolina, kako bi se zaštitilo lišće od oksidativnog oštećenja u sušnom periodu, naročito tokom jula meseca. *P. alba* je pokazao najviši antioksidativni kapacitet u julu mesecu, kada se pokazalo da je akumulacija antioksidativnih molekula indukovana stresogenim faktorom - sušom, najviši. Ovo je pokazatelj centralne uloge prolina u odgovoru na oksidativni stres u biljci bele topole (Štajner et al., 2011).

Uticaj taloženja jona teških metala u tlu, poreklom od bakrenih peći za topljenje, analiziran je kroz lipidnu peroksidaciju i aktivnost antioksidativnih enzima u korenju dve vrste topole (*Populus nigra* L. i *Populus deltoides* Bartr. ex Marsch). Uzorkovana su zrela stabla, koja su rasla i razvijala se u stvarnom okruženju, veoma blizu bakrenih peći. U obe analizirane vrste, teški metali su stimulisali hiperprodukciju slobodnih radikala u korenju (što je dovelo i do akumulacije MDA, koji je meren), što je direktno uticalo na ubrzavne starenja jedinki. U mladom, sitnom korenju, teški metali su smanjili aktivnost gvajakol-peroksidaze i poremetili proces lignifikacije. Nasuprot tome, aktivnosti askorbat peroksidaze i glutation reduktaze su ostale nepromenjene pod uticajem teških metala. U slučaju superoksid dismutaze, jasan porast aktivnosti enzima zabeležena je samo u *P. nigra* L. u uslovima suše, dok je aktivnost smanjena ili nepromenjena u uslovima zagađenja teškim metalima (Stobraw i Lorenc-Plucinska, 2007, 2008).

Kebert et al., (2011) su takođe vršili ispitivanje uticaja različitih vrsta i koncentracija kontaminanata na oksidativni stres nekoliko klonova topola. Oni su analizirali antioksidativni kapacitet klonova topola PE 19/66, B229 (*Populus deltoides*) i klon Pannonia (*Populus x euramericana*) u lišću, nakon tretmana teškim

metalima, herbicidima, dizel gorivima, kao i kombinacijom teških metala i dizel goriva u eksperimentalnom polju. Meren je ukupni antioksidativni kapacitet pomoću FRAP metode. Prema rezultatima, sva tri kloni su pokazala povećani ukupni antioksidativni kapacitet u uslovima povećane količine zagađivača, u odnosu na kontrole.

U svojim eksperimentima, Nikolić et al., (2008) su utvrdili da je došlo do promene u antioksidativnoj odbrani i u korenju i lišću hibridne topole (*Populus nigra* × *maximowiczii* × *P.nigra* var. *Italica*), koja je testirana na dve koncentracije kadmijuma. Učinak na katalazu i SOD u listu bile su slične: na nižim koncentracijama kadmijuma njihove aktivnosti su povećane, a na većim koncentracijama su smanjene. Aktivnost SOD je smanjena u korenju i povećana u lišću tretiranih biljaka.

Rezultati istraživača iz Kine su pokazali da i drugi geografski faktori imaju uticaj na efikasnost odbrane vrsta *Populus* na oksidativni stres izazvan sušom. Oni su eksperimente vršili na vrstama *Populus kangdingensis* C. Wang et Tung i *Populus cathayana Rehderu*, poreklom iz različitih delova istočnih Himalaja, tj. ispitivani su tokom jednog vegetacionog perioda u stakleniku, kako bi se utvrdio uticaj progresivne stresne suše. Rezultati su pokazali da su adaptivni odgovori na ovu vrstu stresa različiti u ove dve vrste, poreklom sa različitih nadmorskih visina. Značajne promene u visinama stabla, razvoja listova, relativnom udelu vode (Relative Water Content - RWC), malonildialdehida i vodonik peroksida su se pojavile ranije u *P. cathayana* nego u *P. kangdingensis*, dok su se promene u rastvorljivim proteinima i ugljenim hidratima, prolinu i antioksidativnim enzimima pojavile ranije u *P. kangdingensis*. *P. kangdingensis* je posedovao veće povećanje u sadržaju rastvorljivih proteina i šećera, ali znatno manje u sadržaju MDA i vodonik peroksida, u odnosu na *P. cathayana*, kada su im reznice bile izložene progresivnom sušnom stresu. Njihovi rezultati pokazuju da je *P. kangdingensis* poreklom sa više nadmorske visine otporniji na sušu nego što *P. cathayana* poreklom sa nižih nadmorskih visina (Yang i Miao, 2010).

Hea et al., (2011) su ispitivali uticaj velike količine Cd^{2+} koji se akumulira u korenu. Akumulacija Cd^{2+} je dovela do smanjenja asimilacije fotosintetskog ugljen-dioksida. Povećan nivo ROS je bio prisutan u svim tkivima, osim u kori. Za borbu protiv Cd^{2+} -indukovanog superoksid-radikala i vodonik peroksida, pokazalo se da se jedinke *P. canescens* oslanjaju uglavnom na formiranje fenolnih jedinjenja, koji se najviše nakupljaju u kori, a najmanje u srži stabla. Ostali potencijalni "hvatači" slobodnih radikala, kao što su prolin, fenoli, vitamini i antioksidativni enzimi su pokazali tkivnu i vremensku specifičnost odgovora na Cd^{2+} . Ovi rezultati pokazuju da su različiti delovi biljke različito sposobni da se bore protiv oksidativnog stresa indukovano Cd^{2+} , verovatno zbog različitog kapaciteta biljnih tkiva kod topola u proizvodnji zaštitnih fenolnih sekundarnih biomolekula.

Istraživanja koja su doprinela bližem razumevanju hemijskog diverziteta unutar roda *Populus* i dali doprinos karakterizaciji jedinjenja koja mogu direktno učestvovati u smanjenju oksidativnog stresa u biljci, sproveli su Dudonne et al., (2010). Oni su ispitali antioksidativna svojstva sekundarnih biomolekula u vodenim

ekstraktima pupoljka crne topole (*Populus nigra*). Analize su pokazale visok sadržaj fenolnih jedinjenja i jaka antioksidativna svojstva, što je određeno ORAC testom.

Genetičko inženjerstvo i strategije upravljanja abiotičkim stresom

Sveobuhvatna analiza transkriptoma *Arabidopsis*-a i *Populus*-a olakšava da se identifikuje povezanost odgovora metaboličkog sistema i uloga različitih gena među homolognim vrstama (Regier et al., 2009). Štaviše, analize transkriptoma mogu da doprinesu da se identifikuju geni koji su uključeni u regeneraciju i otpornost vrsta *Populus* i *Eucalyptus* i time uspostave strategije za modifikaciju ključnih gena koji će ubrzati razvoj molekularne karakterizacije funkcije kodirajućeg dela genoma kod drugih drvenastih vrsta. Ove studije će takođe obezbediti mere za proizvodnju tzv. "super-drvenaste biljke", koja može posedovati više korisnih osobina, kao što je npr. otpornost na različite stresove iz neposredne okoline (Osakabe et al., 2011).

Biljni specifični GRAS/SCL transkripcioni faktori imaju različite uloge u razvoju odgovora biljke na stres (Galović et al., 2012a). SCL (ScareCrow-Like) gen *PeSCL7* iz topola je funkcionalno okarakterisan u *Arabidopsis thaliana*, naročito u pogledu njegove uloge u uslovima abiotičkih stresova. Analiza ovog gena u topolama otkrila je da postoji izrazita ekspresija *PeSCL7* gena u slučajevima suše i povećanog saliniteta, ali je isto tako potisnuta od strane giberelinske kiseline tokom regeneracije listova. Transgene *Arabidopsis* biljke koje imaju naglašenu ekspresiju *PeSCL7* su pokazale povećanu toleranciju na sušu i tretmane solima. Ovi rezultati ukazuju na to da *PeSCL7* kodira članove stres-odgovornih GRAS/SCL transkripcionih faktora koji mogu biti potencijalno korisni za genetičko inženjerstvo drveća tolerantnih na sušu i salinitet (Ma et al., 2010).

Topola transformisana genom za citosolni izozim glutamin sintetazu iz bora (GS1; pogledati NCBI: P52783) je pokazala veći stepen tolerantnosti na stres suše nego divlji tip topole. Na svim nivoima dostupnosti vode, transgeno drveće je imalo veći stepen fotosinteze i funkcionalnost stoma nego odgovarajuće kontrole. Sve linije koje sadrže GS1 su isto tako pokazale ireverzibilnu smanjenu efikasnost e^- transfera na nivou antena u fotosistemu II, posle suše i tokom oporavka, ali povećani kapacitet za fotoasimilaciju transgenih topola je omogućio više uvida u foto-zaštitne mehanizme (FAO, UN, 2010).

Mlado drveće topola (*Populus deltoides*, *Dvina* i *Populus x canadensis*, I-214) je bilo uzgajano pod uslovima smanjene dostupnosti vode u zemljištu. Intenzitet stresa je praćen preko sledećih parametara: sadržaj vode u zemljištu, vodni potencijal u mladim listovima, relativni sadržaj vode u listovima, rast lišća, provodljivost lišća, maksimalna fotosinteza i maksimalno dnevno smanjenje izbojaka u visini. Posle 16 dana nakon potpunog povlačenja vode, region kambijuma je bio uzorkovan pomoću tehnike ljuštenja. Analiza transkripata je bila sprovedena na izolovanoj RNK iz regiona kambija liofiliziranih izbojaka pomoću kvantitativnog RT-qPCR koristeći gene čija je ekspresija pokazana tokom aktiviranja dve signalne mreže usled stresa vodnog deficita (Giovannelli et al., 2010). Rezultati su

pokazali da su pod ovim uslovima topole redukovale funkcije stoma, kako bi smanjile gubitak vode zatvaranjem stoma, što je povezano sa premeštanjem vodnih rezervi biljke iz izbojaka do lišća i primarnih meristema. Posle 16 dana odloženog navodnjavanja zemljišta, značajne promene su zabeležene između tretmana genotipova u smislu relativnog sadržaja vode u lišću, ukupni broj lišća, ukupna lisna površina i povećana dužina izbojaka. Hibrid topole I-214 je pokazao veću prilagodljivost na vodni stres nego hibrid topole Dvina. RT-qPCR analiza je pokazala razlike na nivou transkriptoma između klonova i gena uključenih u regulaciju različitih signalnih i metaboličkih mreža (Giovannelli et al., 2010).

ZAKLJUČAK

Sve učestalije i naglije promene uslova spoljašnje sredine nameću potrebu za gajenjem biljaka koje su tolerantne na različite abiotičke stresove. Pored stresova, kao što su suša, povišena temperatura, salinitet, teški metali, biljke se sve više suočavaju sa istovremenim delovanjem više nepovoljnih faktora. Zbog toga je od fundamentalnog značaja proučavanje fizioloških, biohemijskih i molekularnih mehanizama odgovora biljaka na abiotičke stresove, a posebno je važno razumevanje procesa regulacije na svim nivoima i usklađivanje odgovora.

Neki geni su jače izraženi, dok su drugi potisnuti u odgovoru na stres. Proteinski produkti stresno-indukovanih gena se često nakupljaju u nepovoljnim uslovima. Funkcije ovih proteina i mehanizmi koji regulišu njihovu ekspresiju su bili centralna istraživanja u fiziologiji stresa poslednjih nekoliko decenija prošlog i ovog veka. Većina istraživanja su bila usmerena na ulogu i dokazivanje ekspresije aktiviranih gena. Podaci ukazuju i na to da je nakupljanje produkata gena takođe uslovljeno i posttranslacionim regulatornim mehanizmima, koji povećavaju količinu specifičnih iRNK, povećavaju translaciju, štite proteine ili menjaju njihovu aktivnost. Korišćenjem tehnika molekularne genetike istraživači su počeli da ispituju odgovor biljaka u vezi sa izlaganjem specifičnim stresovima.

Najbolje su proučeni mehanizmi tolerancije kod zeljastih biljaka, kao što je *Arabidopsis thaliana* i stečena saznanja se mogu primeniti i na drvenaste vrste biljaka, ali se zbog specifičnosti ovih biljaka vrše intenzivna proučavanja na vrstama roda *Populus* kao model biljkama. Akumuliranje znanja o funkcionalnim proteinima i protektivnim molekulima, o regulatorima odgovora, kao što su transkripcioni faktori, male RNK i fitohormoni, a posebno o njihovim interakcijama, pruža mogućnosti za primenu novih pristupa u borbi sa abiotičkim stresovima, kao što je genetičko inženjerstvo.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekata III43007 integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja za period 2011-2014 i projekta osnovnih istraživanja 173005 za period 2011-2014, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Barakat A., Wall PK., Diloreto S., Depamphilis CW., Carlson JE. (2007): Conservation and divergence of microRNAs in *Populus*. BMC Genomics 8: 481-489
- Bolu W., H., Polle A. (2004): Growth and stress reactions in roots and shoots of a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*), Tropical Ecology 45(1): 161-171, ISSN 0564-3295 International Society for Tropical Ecology
- Bonnet E., Van de Peer Y., Rouse P. (2006): The small RNA world of plants. New Phyt 171(3): 451-468
- Borsani O., Zhu J., Verslues PE., Zhu JK. (2005): Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. Cell 123: 1279-1291
- Campbell A. (2010): Drought response of *Populus* transformed with stress response transcription factors. Master's Thesis, University of Tennessee
- Chaudiere J., Ferrari-Iliou R. (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem. Tox. 37, 949
- Chen J., Xia X., Yin W. (2009): Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica*. Biochem Biophys Res Commun 16: 483-487
- Close TJ. (1997): Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiol Plant 100: 291-296
- Cramer G., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. (2011): Effects of abiotic stress on plants: a system biology perspective. BMC Plant Biol 11: 163-176
- Dudonne S., Poupard P., Coutiere P., Woillez M., Richard T., Merillon J., Vitrac X. (2011): Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging, J. Agric. Food Chem., 59, 4527–4536
- Forests and genetically modified trees, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2010
- Fujii H., Zhu JK. (2009): An autophosphorylation site of the protein kinase SOS2 is important for salt tolerance in *Arabidopsis*. Mol Plant 2: 183-190
- Fujita Y., Fujita M., Satoh R., Maruyama K., Parvez MM., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2005): AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell 17(12): 3470-343488
- Galović V., Orlović S. (2007): Overview of DNA based studies of genetic variability in Poplars, Topola 179/180: 71-79

- Galović V., Fladung M., Szabados L., Orlović S., Trudić B. (2012a): Improving tolerancy to drought and saline stresses of poplar clones using *GRAS/SCL TF*, a gene encoding a transcription factor, Book of abstracts: International scientific conference: "Forestry science and practice for the purpose of Sustainable development of forestry" Banja Luka, Republic of Srpska, BiH. pp.107
- Galović V., Szabados L., Orlović S., Fladung M., Trudić B., Pekeč S. (2012b): Platform for testing different stress inducible genes on poplars, Book of Abstracts: International scientific conference: "Forestry science and practice for the purpose of Sustainable development of forestry" Banja Luka, Republic of Srpska, BiH., pp.108
- Giovannelli A., Emiliani G., Traversi L. M., Chiarabaglio P.M., Pallara G., Racchi M. L. (2010): Effect of water deficit on wood formation of poplar clones: physiological and transcriptional analysis in cambial region, Italy, Fifth international Poplar Symposium, Poplars and Willows: from research models to multipurpose trees for bio-based society, Book of abstracts, Italy
- Hea J., Qina J., Longa L., Maa Y., Lib H., Lic K., Jiange X., Liub T., Polle A., Lianga Z. and Zhi-Bin, Luoa (2011): Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus×canescens*, *Physiologia Plantarum*
- 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
- Hong-Shuang Ma, Dan Liang, Peng Shuai, Xin-Li Xia and Wei-Lun Yin (2010): The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 14, pp. 4011–4019
- Inze D., Van Montagu M. (1995): Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 6, 153
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis BE., Murata Y., Kwak JM. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20520-20525
- Jia X., Ren L., Chen QJ., Li R., Tang G. (2009a): UV-B-responsive microRNAs in *Populus tremula*. *J Plant Physiol* 166: 2046-2057
- Jia X., Wang WX., Ren L., Chen QJ., Mendu V., Willcut B., Dinkins R., Tang X., Tang G. (2009b): Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 71: 51-59
- Jovanović Ž., Stanisavljević Nj., Radović S., Mikić A., Maksimović V. (2011a): Expression profiling of DREB2A-type gene from pea (*Pisum sativum* L.). Model Legume Congress, Sainte Maxime, France, 15-19. 5. 2011. Book of Abstracts, pp.115

- Jovanović Ž., Maksimović V., Radović S. (2011b): Biochemical and molecular changes in buckwheat leaves during exposure to salt stress. *Arch Biol Sci* 63(1): 67-77
- Katanić M., Tomović Z., Pilipović A., Orlović S., Krstić B. (2006): Uticaj kadmijuma na rast izdanaka topola sekcije *Leuce* u kulturi tkiva, *Topola*, 177/178: 88-105
- Kebert M., Trudić B., Stojnić S., Orlović S., Štajner D., Popović B., Galić Z. (2011): Estimation of antioxidant capacities of poplar clones involved in phytoremediation processes, STREPOW International Workshop, Book of proceedings, pp. 273-281
- Kobayashi Y., Murata M., Minami H., Yamamoto S., Kagaya Y., Hobo T., Yamamoto A., Hattori T. (2005): Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* 44: 939-949
- Krstić B., Oljača R., Stanković D. (2011): Fiziologija drvenastih biljaka, Univerzitet u Banjoj Luci, Univerzitet u Novom Sadu
- Lin PC., Pomeranz MC., Jikumar Y., Kang SG., Hah C., Fujioka S. (2011): The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses. *Plant J*, 65:253-68.
- Liu C., Li CM., Liu BG., Ge SJ., Dong XM., Li W., Zhu HY., Wang BC., Yang CP. (2012): Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). *Plant Mol Biol Rep* 30: 848-859
- Lorenzo O., Solano R. (2005): Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Curr Opin Plant Biol* 8: 532-540
- Lu S., Sun YH., Chiang VL. (2008a): Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant J* 55: 131-151
- Lu S., Sun ZH., Shi R., Clark C., Li L., Chiang VL. (2005): Novel and mechanical stress-responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 2186-2203
- Lu S., Yang C., Chiang VL. (2011): Conservation and diversity of microRNAs-associated copper-regulatory networks in *Populus trichocarpa*. *J Integr Plant Biol* 53(11): 879-891
- Lu SF., Li LG., Yi XP., Joshi CP., Chiang VL. (2008b): Differential expression of three eucalyptus secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. *J Exp Bot* 59: 681-695
- Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A., Grill E. (2009): Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068
- Mallory A., Vaucheret H. (2006): Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* 38: S31-S36
- Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito Y., Seki M., Goda H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004): Identification

- of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using microarray systems. *Plant J* 38(6): 982-993
- Migeon A., Audinot J., Eybe T., Richaud P., Damien B., Migeonb H., Chalota M. (2010): Cadmium and zinc localization by SIMS in leaves of *Populus deltoides* (cv. Lena) grown in ametal polluted soil, SIMS Proceedings Papers
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti VB., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van BF. (2011): ROS signaling: the new wave?. *Trends Plant Sci* 16(6): 300-309
- Miura K., Jin JB, Hasegawa PM. (2007): Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10: 495-502
- Navarro M., Ayax C., Martinez Y., Laur J., El Kayal W., Marque C., Teulieres C. (2011): Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. *Plant Biotechnol J* 9: 50-63
- Nikolić N., Kojić D., Pilipović A., Pajević S., Krstić B., Borišev M., Orlović S. (2008): Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity, *Acta biologica cracoviensia, Series Botanica* 50/2: 95–103
- Osakabe Y., Kajita S., Osakabe K. (2011): Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment, *Physiologia Plantarum*, 142: 105–117
- Park S., Fung P., Nishimura N. (2009): Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071
- Qin F., Sakuma Y., Tran LP. (2008): Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 20: 1693-1707
- Rama Devi S., Prasa D. M. N. V. (1998): Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138, 157
- Regier N., Streb S., Coccozza C., Schaub M., Cherubini P., Zeeman S.C., Frey B. (2009): Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) Clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defense. *Plant, Cell and Environment* 32:1724–1736
- 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* 18(5): 1292-1309
- Seo PJ., Fengning X., Meng Q., Ju-Yong P., Young NL., Sang-Gyu K., Yong-Hwan L., Woong JP., Chung-Mo P. (2009): The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 275-289

- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410-417
- Štajner D., Orlović S., Popović B., M., Kebert M., Galić Z. (2011): Screening of drought oxidative stress tolerance in Serbian melliferous plant species, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(9), pp. 1609-1614
- Stobraw K., Lorenc-Plucińska G. (2007): Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra L.*) and cottonwood (*Populus deltoides Bartr. ex Marsch*) in a heavy-metal-polluted environment, *Plant Soil*, 298:57–68
- Stobraw K., Lorenc-Plucińska G. (2008): Thresholds of heavy-metal toxicity in cuttings of European black poplar (*Populus nigra L.*) determined according to antioxidant status of fine roots and morphometrical disorders, *Science of the total environment*, 39086–96
- Tang R.J., Liu H., Bao Y., Lv QD, Yang L., Zhang HX. (2010): The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Mol Biol* 74: 367-380
- Tausz M., Wonisch A., Grill D., Morales D., Jimenez M. S. (2003): Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *J. Exp. Bot.* 54, 1505
- Teige M., Scheiki E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 15: 141-152
- Tran LP., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007): Functional analysis of AHK1/ATKH1 and cytokinin receptor histidine kinase in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623-20628
- Trudić B., Galović V., Orlović S., Pekeč, S., Klačnja B. (2012): Possibility for developing of poplar tolerant to drought in Republic of Serbia, Book of abstracts: 24th Session of the International Poplar Commission and 46th Executive Committee Meeting- " Improving Lives with Poplars and Willows ", Dehradun, India
- Tuskan et al. (2006): The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. And Gray), *Science*, 313, 1596-1604
- Xiao X., Yang F., Zhang S., Korpelainen H., Li C. (2009): Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol Plant* 136: 150-168
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006): Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57: 781-803
- Yang CX., Li HG., Cheng QA., Chen Y. (2009): Transformation of drought and salt resistant gene (*DREB1C*) in *Populus x euramericana* cv. Nanlin 895. *Scientia Silvae Sinicae* 45(2): 17-21

- Yang F. and Miao L.F. (2010): Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fennica* 44(1): 23–37
- Yoo S.D., Cho Y., Sheen J. (2009): Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci* 14(5): 270-279
- Wang D, Guo Y, Wu C, Yang G, Li Y, Zheng G. (2008): Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics*, 9:44.

Summary

MOLECULAR MECHANISMS OF WOODY PLANT SPECIES ABIOTIC STRESS RESPONSE

by

Trudić Branislav, Radović Svetlana, Galović Vladislava, Jovanović Živko, Stanisavljević Nemanja

Abiotic stresses are major causes of loss of agricultural production and natural vegetation, because they cause many morphological, physiological, biochemical and molecular changes that affect plant growth and productivity. Knowledge about and "management" of abiotic stresses are especially important for long-term growth and survival of woody plant species World-wide. Adaptation of plants to stresses from the environment is mediated by a series of highly coordinated and complex signaling pathways. Stress-sensing mechanisms regulate different cellular and molecular events in plants and the expression of various stress-tolerant genes.

Species of the genus Populus have been chosen as a model for the study of woody species in molecular biology and biochemistry because of its characteristics such as rapid growth, relatively small genome, developed experimental protocols for transformation and regeneration in vitro etc. Characteristics mentioned above make the use of modern methods of molecular biology to study the fundamental processes that are essential for growth, development, stress response and productivity of tree species, including the application of recombinant DNA technology (genetic engineering).

The first sequenced genome of a woody species is Populus trichocarpa genome. The genome is about 50 times smaller than the genome of pine, about 4 times larger than the genome of Arabidopsis thaliana, the most important model organism in plant molecular biology. Although woody species have their own specifics, the fundamental mechanisms of development and response to abiotic factors are in majority common to all plant species. After detection of abiotic stress, one way of plants reaction to it is a change in the expression of the corresponding genes. Products of the activities of these genes can be divided into two groups: the first group consists regulators of gene expression and signaling pathways (protein kinases, phosphatases, transcription factors, enzymes of metabolism of

phospholipids), and others are functional molecules that are directly involved in tolerance to stress, such as various antioxidants, chaperones, osmotic protectants etc.

Some of the transcription factors involved in stress response are regulated at a posttranslational level through post translational modifications and are usually involved in the early and rapid responses to stress. The most common post translational modifications are phosphorylation, ubiquitination and sumoilation. Small non-coding RNAs are an important class of regulators of gene expression in eukaryotes and involved processes, such as post-transcriptional gene silencing and transcriptional gene silencing. Fundamental processes of synthesis and function of small non-coding RNA are common to all eukaryotes, but there are many mechanisms specific to the type of organism. Based on the biogenesis, small RNAs are divided into two main classes: siRNK (short interfering RNA) and miRNA (micro RNA). In addition to the abscisic acid (ABA) and other plant hormones play an important role in coordinating the response to the stressful events. These are primarily hormones like ethylene, jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) and have been shown to interact with the ABA signaling pathways. Ethylene is involved in the response to drought, ozone, hypoxia, heat, cold, UV-B radiation and injury.

Poplars can accumulate high concentrations of heavy metal ions such as cadmium, nickel, zinc, copper and lead in the aboveground tissues. Accumulation of cadmium ions in the poplar is 30 times higher than other woody species, which is reflected in their advantage in the highly polluted regions afforestation. However, the exact localization of heavy metals, especially zinc and cadmium in plant cells is still unknown in this species. In those and other related abiotic stress conditions, poplars showed acceptable antioxidative answer, suggesting being a recognized source of various antioxidant molecules-phenolics, vitamins, enzymes etc.

Comprehensive transcriptome analysis of *Arabidopsis* and *Populus* is easier to identify the connection between the metabolic response of the system and the role of homologous genes among different species. Moreover, transcriptome analysis can contribute to identify genes involved in resistance and regeneration of *Populus* species, thereby establishing strategies for the modification of key genes that will accelerate the development of molecular characterization of the functions of the genome coding for other tree species. These studies will also provide measures for the production of so-called "super-tree" which may have several useful features, such as resistance to various stresses in nearby environment.