

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Živko S. Jovanović

**ULOGA TRANSKRIPCIONOG FAKTORA
DREB2A I MALIH RNK miR398a/b I miR408 U
ODGOVORU GRAŠKA (*Pisum sativum* L.)
NA DEHIDRATACIJU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Živko S. Jovanović

**THE ROLE OF DREB2A TRANSCRIPTION
FACTOR AND SMALL RNAs miR398a/b AND
miR408 IN DEHYDRATION RESPONSE OF
PEA (*Pisum sativum* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

MENTOR DOKTORSKE DISERTACIJE: prof dr Svetlana Radović, redovni profesor
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr Svetlana Radović, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Dr Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu
3. Dr Vesna Maksimović, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

DATUM ODBRANE: _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Svetlani Radović, kao i članovima Komisije za odbranu doktorske disertacije. Takođe, veliku zahvalnost dugujem kolegama iz IMGGI, kao i iz ITQB-Lisabon. Hvala Aleksandru Mikiću na materijalu korišćenom u doktorskoj disertaciji.

A. Jovanović

ULOGA TRANSKRIPCIONOG FAKTORA DREB2A I MALIH RNK miR398a/b I miR408 U ODGOVORU GRAŠKA (*Pisum sativum* L.) NA DEHIDRATACIJU

REZIME

Jedan od glavnih faktora abiotičkog stresa kod biljaka je dehidracija. U ovom radu ispitivan je uticaj dehidracije na ekspresiju gena za transkripcioni faktor DREB2A i malih RNK miR398 i miR408 graška, u cilju sagledavanja značaja ovih molekula u odgovoru graška na dehidraciju i rehidraciju.

Parcijalna cDNK (*PsDREB2A*) koja kodira za DREB2A transkripcioni faktor graška je dobijena primenom metode PCR sa prajmerima dizajniranim na osnovu sekvenci *DREB2A* gena iz model leguminoze *Medicago truncatula*. Dobijena sekvenca (495 bp) deponovana je u GeneBank (HM229349). Poređenje nukleotidnih sekvenci pokazalo je da je dobijena sekvenca najbližnja sa sekvencom za *DREB2A* iz *M. truncatula*, kao i sa *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) iz iste vrste. Analiza izvedene aminokiselinske sekvence pokazala je da *PsDREB2A* ima strukturu karakterističnu za DREB2A protein - prisustvo konzervisanog AP2 domena (17-55 aa), kao i da ima najveću homologiju sa DREB2A i sa ERBP proteinom iz *M. truncatula*. Na osnovu kompjuterske predikcije posttranslacionih modifikacija proteina utvrđeno je prisustvo jednog potencijalnog mesta za sumoilaciju proteina, i to na poziciji Lys157 (MKQE), kao i prisustvo nekoliko potencijalnih mesta za fosforilaciju, najverovatnije protein kinazom A.

U cilju ispitivanja ekspresije gena za DREB2A transkripcioni faktor graška vršene su analize iRNK korena i nadzemnog dela graška u normalnom fiziološkom stanju, kao i u uslovima dehidracije u trajanju 7 i 10 dana, i rehidracije. Primenjena je metoda Real-time PCR uz upotrebu proba specifičnih za *PsDREB2A*. Pokazano je da se profil ekspresije razlikuje u korenu i nadzemnom delu biljaka. Kod korena maksimalni nivo ekspresije *PsDREB2A*

utvrđen je nakon 10 dana tretmana, dok je kod nadzemnog dela biljaka maksimum dostignut nakon 7 dana dehidracije.

Takođe je ispitivana ekspresija konzervisanih mikro RNK- miR398a/b i miR408 tokom dehidracije i rehidracije biljaka. Northern blot analiza, uz upotrebu odgovarajućih LNA proba, pokazala je da su ispitivane mikro RNK najviše zastupljene kod kontrolne grupe biljaka. Tokom stresa, odnosno dehidracije, dolazi do progresivnog smanjenja nivoa odgovarajućih miRNK, kako u korenovima, tako i u nadzemnim delovima dehidratisanih biljaka.

Osim toga, Metodom Real-time PCR su detektovane promene u ekspresiji potencijalnih target gena ispitivanih mikro RNK – *CSD*, *COX5b* i *P_{1B}-ATP-aze*. Od navedenih gena jedino kod *COX5b* gena nije utvrđena promena u nivou zastupljenosti iRNK tokom dehidracije i rehidracije biljaka. Primećeno je da je ekspresija *CSD* gena u inverznoj korelaciji sa ekspresijom odgovarajuće miRNK, tako da je najniži nivo ekspresije zabeležen kod kontrolne grupe biljaka, dok se pod tretmanima nivo ekspresije *CSD* povećava. Ekspresija *P_{1B}-ATP-aze* je promenjena dejstvom dehidracije jedino kod nadzemnog dela biljaka, a najveća promena je zabeležena kod rehidratisanih biljaka. U slučaju korenova ekspresija ovog gena je nepromenjena.

Ključne reči: dehidracija, grašak, transkripcioni faktor, DREB2A, male RNK, miR398, miR408.

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: MOLEKULARNA BIOLOGIJA

UDK BROJ: 581.552.4:551.557.38(0433)

THE ROLE OF DREB2A TRANSCRIPTION FACTOR AND SMALL RNAs miR398a/b AND miR408 IN DEHYDRATION RESPONSE OF PEA (*Pisum sativum* L.)

SUMMARY

Adverse environmental stresses, such as drought, low temperature and soil salinity have a strong influence on agricultural production and sustainability. A major limitation to yield and quality in many crop species is water availability throughout or at critical times during the growing season. We investigated the effect of dehydration on expression of DREB2A transcription factor in pea, as well as on the expression of conserved miRNAs-miR398a/b and miR408.

Partial cDNA (*PsDREB2A*), which encodes a DREB2A transcription factor in pea, was obtained by PCR with primers designed according to *DREB2A* gene from the model legume *Medicago truncatula*. The resulting sequence (495 bp) has been deposited in Gene Bank (HM229349). Comparison of nucleotide sequences showed that the obtained sequence is most similar to the sequence of *DREB2A* from *M. truncatula*, and with *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) from the same species. Analysis of deduced amino acid sequence showed that *PsDREB2A* has a structure characteristic of the DREB2A protein - presence of AP2 domains (17-55 a.a.), and has the highest homology with DREB2A and ERBP protein from *M. truncatula*. Computer prediction of post-translational modification of protein revealed the presence of a potential site for protein sumoylation, at the position of Lys157 (MKQE), and the presence of several potential sites for phosphorylation.

To study the expression of *PsDREB2A* we performed the analysis of mRNA level in pea root and shoot in a normal physiological state, as well as during dehydration for 7 and 10 days, and rehydration. Real-time PCR using a probe specific for *PsDREB2A* has been applied. It has been shown that the expression profile was different in roots and aerial parts of the plants. In the

roots the maximum level of expression *PsDREB2A* was determined after 10 days of treatment, while in the above-ground parts of plants the maximum was reached after 7 days of dehydration.

We also studied the expression of conserved micro RNAs- miR398a/b and miR408 during dehydration and rehydration of plants. Northern blot analysis, using the appropriate LNA probes, showed that RNAs were most abundant in the control group of plants. During dehydration stress, there was a progressive reduction of the level of investigated miRNAs, both in roots and in the above-ground parts of plants..

In addition, using Real-time PCR changes in the expression level of potential target genes of selected miRNAs - CSD, COX5b and P_{1B}-ATPase have been investigated. The level of *COX5b* gene has not been changed dehydration and rehydration of plants. It is noted that the *CSD* expression level correlated inversely with the expression of the corresponding miRNA, so that the lowest level of expression was noted in the control group of plants, while under treatment the level of expression of CSD has been increased. Expression of P_{1B}-ATP-ase was changed during dehydration only in above-ground parts of plants, and the biggest change was observed in rehydrated plants. In the roots the expression of this gene was unaffected.

Keywords: dehydration, pea, transcription factor, DREB2A, small RNA, miR398, miR408.

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SCIENTIFIC DISCIPLINE: MOLECULAR BIOLOGY

UDC NUMBER: 581.552.4:551.557.38(0433)

SADRŽAJ

UVOD.....	1
Abiotički stres.....	1
Dehidracija.....	2
Odgovor biljaka na abiotički stres.....	2
Fiziološki i biohemijski odgovor.....	3
Molekularni odgovor.....	5
Transkripcioni faktori.....	6
Transkripcioni faktori u odgovoru biljaka na abiotički stres.....	7
AREB/ABF regulon.....	8
MYC/MYB regulon.....	9
CBF/DREB regulon.....	11
NAC (NAM, ATAF i CUC) i ZF-HD regulon.....	15
Ostali transkripcioni faktori uključeni u odgovor na stres.....	16
Mikro RNK.....	18
Biogeneza mikro RNK biljaka.....	18
Mehanizam delovanja miRNK biljaka.....	22
Regulacija aktivnosti miRNK biljaka.....	24
Uloga miRNK u odgovoru biljaka na abiotički stres.....	25
Osmotski stres: dehidracija, salinitet i abscisinska kiselina.....	26
Oksidativni stres.....	28
Hipoksija.....	29
UV zračenje.....	30
Niske temperature.....	30
Grašak.....	31
CILJ RADA.....	34
MATERIJAL I METODE.....	35
Biljni materijal i tretmani.....	35
Biljni materijal.....	35
Tretmani.....	35
Određivanje relativnog sadržaja vode.....	36
Određivanje nivoa lipidne peroksidacije.....	36

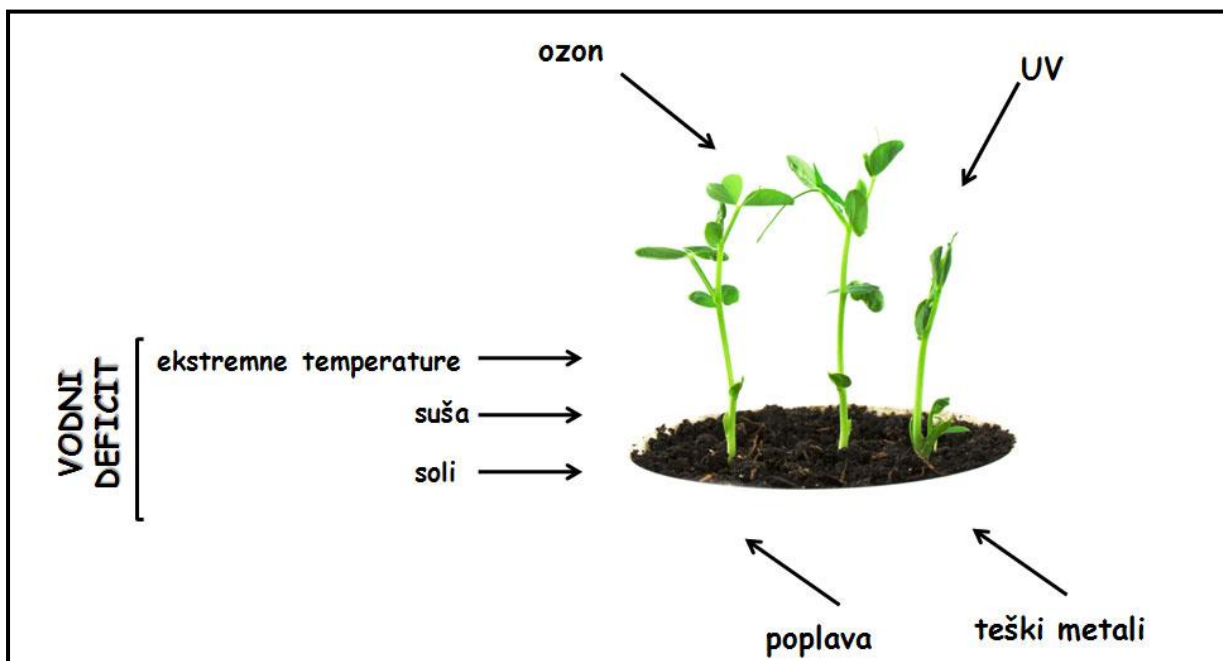
Određivanje količine ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)	37
Osnovne procedure rada sa RNK	37
Izolovanje ukupne RNK	37
Izolovanje ukupne RNK za Northern blot metodu	38
Provera integriteta i kvantifikacija RNK	39
Reverzna transkripcija (RT)	39
Northern blot	40
Elektroforeza RNK	40
Prenos RNK na membranu	41
Radioaktivno obeležavanje proba	41
Hibridizacija	42
Osnovne procedure rada sa DNK	43
Izolovanje genomske DNK	43
Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)	43
Umnožavanje fragmenata DNK	43
RT-PCR reakcija amplifikacije PsDREB2A	45
Analiza produkata PCR i RT-PCR na agaroznom gelu	46
Prečišćavanje PCR produkata	46
Sekvenciranje PCR produkata	47
Analiza ekspresije gena pomoću "Real-Time" PCR (qPCR) metode	48
Statistička analiza	50
REZULTATI	51
Morfološke promene i relativni sadržaj vode (RWC)	51
Akumulacija ukupnih reaktivnih vrsta kiseonika	52
Lipidna peroksidacija	53
Izolovanje dela gena za DREB2A transkripcioni faktor graška	54
PCR amplifikacija PsDREB2A i analiza sekvence	55
Profil ekspresije <i>PsDREB2A</i> gena	60
Analiza ekspresije PsDREB2A gena u uslovima dehidracije metodom Real-time PCR ...	60
Profil ekspresije miRNK	61
Analiza ekspresije miRNK miR398a/b i miR408 u korenovima i nadzemnom delu biljke	

Northern blot metodom	61
Analiza ekspresije target gena miRNK u uslovima dehidracije metodom Real-time PCR ..	62
Standardizacija Real-time PCR za gene CSD, COX5b i P _{1B} -ATP-aza	62
Ekspresija CSD gena tokom dehidracije graška	64
Ekspresija COX5b gena tokom dehidracije graška	65
Ekspresija gena za P _{1B} -ATP-azu tokom dehidracije graška	65
DISKUSIJA	67
ZAKLJUČCI	78
LITERATURA	80

UVOD

Abiotički stres

Biljke su konstantno izložene različitim uslovima životne sredine, kao što su suša, salinitet, ekstremne temperature, UV zračenje, teški metali, hipoksija (Slika 1). Ovi faktori, zajednički nazvani kao faktori abiotičkog stresa, ograničavaju rast biljaka, što kao posledicu ima smanjenu produktivnost i značajano smanjenje prinosa poljoprivredno značajnih kultura. Suša i salinitet uzrokuju probleme na više od 10% obradivih površina, i dovode do smanjenja prinosa značajnih kultura za oko 50% posmatrano na globalnom nivou (Bray *et al.*, 2000). Otpornost ili senzitivnost na ove faktore je vrlo bitna, imajući u vidu da oni mogu uticati na različite faze rasta i razvića biljaka, kao i da navedeni faktori mogu sinergistički delovati (Chinnusamy *et al.*, 2004). Stoga otkriće mehanizama koje leže u osnovi tolerancije na abiotički stres i na adaptacije na njega predstavlja glavni pravac savremenih istraživanja.



Slika 1. Faktori abiotičkog stresa

Dehidracija

Voda predstavlja jedan od bitnih faktora koji utiče ne samo na za rast i razvoj biljaka, već i na njihovu produktivnost i geografsku distribuciju. Promene u vodnom potencijalu u staništu mogu dovesti do pojave osmotskog stresa, remeteći normalno funkcionisanje ćelija i tkiva. Slične efekte uzrokuju i niske temperature, pri čemu biljke dolaze u stanje „fiziološke suše“ kada vode ima, ali ona nije dostupna biljci.

Vodni deficit nastaje kada postoji disbalans između količine vode koja je dostupna biljci i nivoa transpiracije. Transpiracija je jedan od najčešćih načina gubitka vode u biljci; količina vode koju biljka može izgubiti putem transpiracije varira od nekoliko mililitara pa do jednog litra po kvadratnom metru površine lista, na jedan sat. Većina cvetnica toleriše gubitak vode do 5-15% RWC (relativnog sadržaja vode u biljci). Tokom evolucije biljke su razvile niz adaptacija kako bi se izborile sa ograničenom količinom vode, te su se tako i razvili mehanizmi za izbegavanje dehidracije i mehanizmi tolerancije na dehidraciju.

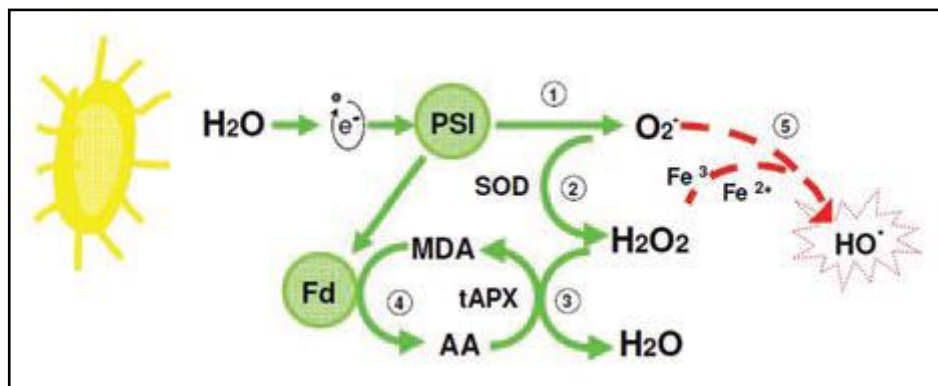
Odgovor biljaka na abiotički stres

Biljke odgovaraju na različite ekološke faktore na kompleksan i integrisani način u zavisnosti od dužine izloženosti koja im dozvoljava da odgovore i da se adaptiraju na trenutne uslove. Otpornost biljaka na stres uključuje promene na nivou kompletne biljke, na tkivnom i ćelijskom nivou, kao i na fiziološkom i molekularnom nivou. Uključivanje pojedinačnih promena ili njihove kombinacije predstavlja kapacitet svake pojedinačne biljke da opstane pod nepovoljnim uslovima životne sredine (Farooq *et al.*, 2009). To se pre svega odnosi na fiziološke i biohemijske promene u biljkama, uključujući uvijanje listova, redukciju lisne površine, abscisiju listova, stimulaciju rasta korena, promene u relativnom sadržaju vode, curenje elektrolita, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, oštećenja membrana i aktivaciju enzima neophodnih za opstanak ćelija (Bartels and Sunkar, 2005). Osim toga, biljni hormon ABA indukuje zatvaranje stoma, redukujući na taj način gubitak vode i fotosintezu.

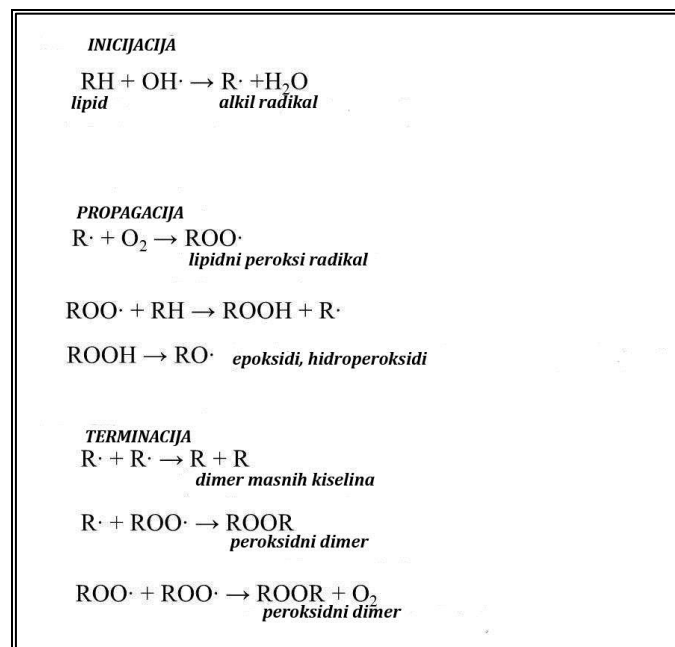
Fiziološki i biohemijski odgovor

Prvi odgovor biljaka na uslove vodnog deficita jeste zatvaranje stoma, a u cilju sprečavanja gubitka vode tokom transpiracije (Hsiao *et al.*, 1973; Taiz and Zeiger, 2002). Zatvaranje stoma kao posledicu ima smanjenje intenziteta fotosinteze usled promene u aktivnosti Rubisco enzima (Taiz and Zeiger, 2002; Bota *et al.*, 2004; Mahajan *et al.*, 2005). Nedostatak vode dovodi do inhibicije rasta (Chaves *et al.*, 2003), deobe i ekspanzije ćelija (Hsiao *et al.*, 1973). Usled smanjenja transpiracije ograničeno je i usvajanje nutrijenata, a poremećaj u aktivnom transportu jona kao i u permeabilnosti membrana ima za posledicu i redukciju apsorpcione moći korena (Tanguilig *et al.*, 1987). Kao jedan od nespecifičnih odgovora na abiotički stres je i produkcija i akumulacija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Boguszewska and Zagdanska, 2012). Ove reaktivne vrste se proizvode i pod normalnim uslovima životne sredine. Međutim, u uslovima vodnog deficita produkcija ROS je povećana, s obzirom da limitirana fiksacija CO₂ redukuje regeneraciju NADP⁺ u Kalvinovom ciklusu, što remeti lanac transporta elektrona (Taiz and Zeiger, 2002). Tokom fotosinteze i u uslovima vodnog deficita dolazi do transporta elektrona na O₂ u Melerovoj reakciji (slika 2). Takođe, u uslovima vodnog deficita je pojačana fotorespiracija, usled maksimalne oksigenacije RuBP (ribulozo-1,5-bisfosfat), što je posledica ograničene fiksacije CO₂ (Carvalho *et al.*, 1998). Kao posledica disbalansa u akumulaciji ROS i mehanizmima uklanjanja (enzimski i neenzimski) dolazi do oštećenja makromolekula proteina, lipida, DNK. Lipidna peroksidacija je jedna od najčešće istraživanih posledica delovanja ROS na strukturu i funkciju lipida membrane (Boguszewska and Zagdanska, 2012). Tokom ovog procesa polinezasićene masne kiseline (PUFA), kao glavne komponente lipidne membrane, reaguju sa ROS formirajući konjugovane diene, lipidne peroksi radikale i hidroperokside (Slika 3), koji predstavljaju veoma reaktivna jedinjenja, a sama reakcija je autokatalizovana (Gill and Tuteja, 2010). U biohemijske odgovore spada i smanjenje osmotskog potencijala ćelija kroz akumulaciju osmolita (Mahajan *et al.* 2005). U osmotski aktivne komponente spadaju cviterjonska jedinjenja (aminokiseline i njihovi derivati), kao što su prolin i dimetilsulfopropionat, kavaternerna jedinjenja amonijaka-glicin betain holin-*O*-sulfat, kao i neki saharidi i

alkoholi (trehaloza, manitol, pinitol) (Taiz and Zeiger, 2002; Seki *et al.*, 2007). Ova jedinjenja su hidrofilna i menjaju molekule vode na površini proteina i membrana, delujući na taj način kao osmoprotektanti i šaperoni male molekulske mase. Osim kao osmoprotektanti, ova jedinjenja mogu biti i iskorišćena i kao izvor ugljenika i azota, a nakon što prođe dejstvo stresogenog faktora.



Slika 2. Produkcija ROS u Melerovoj reakciji (Cravalho *et al.*, 1998)

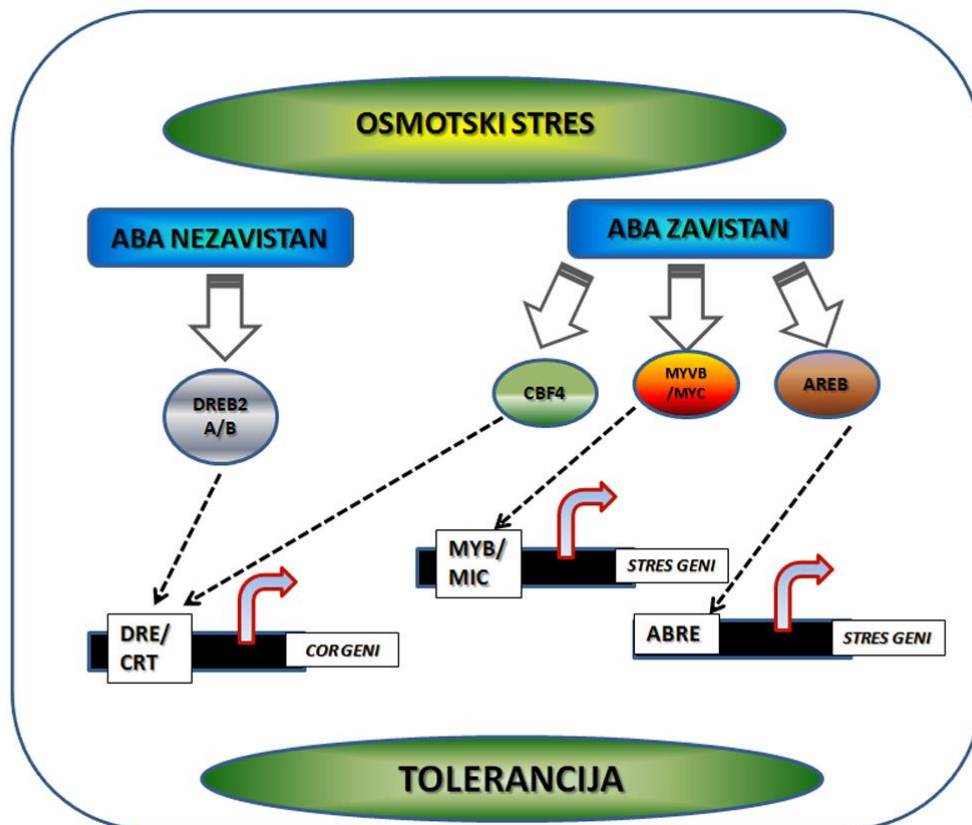


Slika 3. Mehanizam nastajanja lipidnih peroksida (Gill and Tuteja, 2010)

Molekularni odgovor

Sa druge strane, molekularne promene uključuju percepciju signala, transdukciju signala, ekspresiju gena i na kraju metaboličke promene u tkivima koje za rezultat imaju povećanje otpornosti na neki od faktora.

Kao odgovor na abiotički stres dolazi do aktivacije niza gena na transkripcionom nivou (Slika 4), a njihovi produkti treba da obezbede toleranciju na stres produkujući proteine od vitalnog značaja (kao što su enzimi), kao i regulišući nizvodne gene (Kavar *et al.*, 2007). Ispitivanje profila transkripta može biti značajno oruđe u karakterizaciji gena odgovornih za otpornost. Takva ispitivanja su dovela do rezultata da ti geni mogu biti klasifikovani u dve grupe (Bohnert *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2002; Fowler and Thomashow, 2002). Prva grupa predstavlja gene koji kodiraju proteine čije je uloga u zaštiti ćelija od efekata vodnog deficita. To su uglavnom geni čiji produkti regulišu akumulaciju osmoprotektanata (enzimi uključeni u biosintezu prolina, betaina, šećera); pasivni i aktivni transport kroz membranu (vodni kanali i membranski transporteri); i zaštitu i stabilizaciju ćelijskih struktura od oštećenja uzrokovanim ROS (enzimi koji uklanjaju ROS - katalaza, SOD, GST, APX itd.); enzimi uključeni u metabolizam masnih kiselina; inhibitori proteaza i drugi proteini koji štite makromolekule (osmotin, šaperoni, LEA proteini). Druga grupa gena čiju ekspresiju indukuju faktori abiotičkog stresa su regulatorni geni. Njihovi produkti su regulatorni proteini koji regulišu transdukciju signala i ekspresiju ostalih gena. Tu pre svega spadaju transkripcioni faktori, proteinske kinaze, fosfataze i proteaze (Seki *et al.*, 2003; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).



Slika 4. ABA zavisan i ABA nezavisan put ekspresije gena tokom osmotskog stresa

Transkripcioni faktori

Transkripcioni faktori (TF) predstavljaju proteine koji sinergistički deluju sa drugim transkripcionim regulatorima, kao što su proteini koji modifikuju i remodeluju hromatin, omogućavajući RNK polimerazi da priđe molekulu DNK i otpočne transkripciju. Približno 7% biljnog genoma čine kodirajuće sekvence za transkripcione faktore, što dokazuje kompleksnost i značaj regulacije ekspresije gena na transkripcionom nivou (Udvardi *et al.*, 2007). Transkripcioni faktori interaguju sa *cis*-elementima u okviru promotorskih regiona gena indukovanih stresom, regulišući na taj način ekspresiju nizvodnih gena, što rezultuje u obezbeđivanju tolerancije na abiotički stres (Agarwal and Jha, 2010).

Transkripcioni faktori u odgovoru biljaka na abiotički stres

Pokazano je da u genomu *Arabidopsis thaliana* oko 1500 TF učestvuje u regulaciji ekspresije gena indukovanih faktorima abiotičkog stresa (Reichmann *et al.*, 2000). Analiza transkriptoma te vrste, kao i drugih model biljaka potvrdila je postojanje nekoliko signalnih puteva koji se nezavisno uključuju kao odgovor biljke na određeni stimulus (na ABA zavisan i ABA nezavisan način), ukazujući da je tolerancija na stres pod kontrolom fine regulatorne mreže (Fowler and Thomashow, 2002; Umezawa *et al.*, 2006).

Fitohormon abscisinska kiseina (ABA) je glavni regulator dogovora biljaka na abiotički stres, pre svega na dehidrataciju, i koordiniše kompleksnu regulatornu mrežu gena, omogućujući biljkama da se izbore sa vodnim deficitom (Cutler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Signalni put u koji je uključena ABA je opisan kao put koji posreduje u adaptaciji na stres indukcijom najmanje dva regulona (grupe gena koje kontroliše određeni TF): AREB/ABF (*ABA-responsive element binding protein/ABA-binding factor*) regulon i MYC (*myelocytomatosis oncogene*)/MYB (*myeloblastosis oncogene*) regulon. Za razliku od ovog puta, u ABA-nezavisne regulone spadaju CBF/DREB regulon i NAC (NAM, ATAF i CUC) i ZF-HD (zinc-finger homeodomain) regulon (Lata and Prasad, 2011). Nekoliko istraživanja je pokazalo i postojanje ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta koji funkcionišu preko AP2/EREBP (ERF) familije (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Kizis and Pages, 2002). Osim navedenih TF postoje i ostali, ne tako malobrojni, takođe uključeni u odgovor na abiotički stres, koji imaju važnu ulogu u odgovoru i adaptaciji biljaka na faktore sredine. Iako ovi TF obično deluju nezavisno jedan od drugog, moguće je da na nekom nivou postoji preklapanje njihovih puteva.

AREB/ABF regulon

Konzervirani *cis* element označen kao ABRE (*ABA-responsive element*, PyACGTGG/TC) identifikovan je u promotorima gena indukovanih ABA (Bray, 1994; Giraudat *et al.*, 1994; Busk and Pages, 1998). Ispitivanjima je utvrđeno da ABRE modulirana ekspresija gena podrazumeva postojanje više ABRE elemenata ili kombinaciju jednog ABRE elementa sa kuplujućim elementom (CE) koji čine funkcionalni promotor (Yoshida *et al.*, 2010). ABRE i CE1 zajedno sa CE3 čine ABA-aktiviran kompleks koji učestvuje u regulaciji *HVA1* i *HVA22* gena pšenice (Shen *et al.*, 1996). Za ekspresiju *RD29B* u semenima i vegetativnim tkivima *A. thaliana* neophodna su 2 ABRE *cis*-elementa (Uno *et al.*, 2000; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006). AREB (AABF) pripadaju grupi bZIP (basic leucine zipper) transkripcionih faktora koji se vežu za ABRE motiv i na taj način dovode do ABA-zavisne aktivacije ekspresije gena. Prvi put su izolovani upotrebom jednohibridnog sistema kvasca (Choi *et al.*, 2000). Pokazano je da u ABA deficijentnom *aba2* i u ABA nesenzitivnom *abil* mutantu AREB proteini ispoljavaju manju aktivnost. Za razliku od njih, ABA hipersenzitivan mutant *eral* pokazuje pojačanu aktivnost. Ovi podaci ukazuju da ovi transkripcioni faktori za svoju aktivaciju zahtevaju signal indukovan ABA (Uno *et al.*, 2000). To može biti objašnjeno ABA-zavisnom fosforilacijom AREB/ABF proteina (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Do sada je identifikovano 75 bZIP proteina u *A. thaliana*, koji su podeljeni u 11 grupa, a ABF proteini pripadaju grupi A, koja obično učestvuje u ABA-posredovanoj signalizaciji tokom maturacije semena ili u odgovoru na stres (Jakoby *et al.*, 2002). Različiti ABF proteini učestvuju u različitim fiziološkim odgovorima - ABF1 u odgovoru na niske temperature, ABF2 u odgovoru na povišenu koncentraciju soli, sušu, glukozu i povišenu temperaturu, ABF3 na povišenu koncentraciju soli, ABF4 u odgovoru na niske temperature, sušu i hladnoću (Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005). Ove proteine fosforiliše kinaza koju aktivira ABA, što ukazuje da ABA-zavisna fosforilacija može biti uključena u aktivaciju AREB subfamilije proteina (Uno *et al.*, 2000). Ove kinaze, koje su kinaze SnRK2 tipa, fosforilišu Ser/Thr ostatke u R-X-X-S/T mestima u konzerviranim regionima AREB1 (Furihata *et al.*, 2006). AREB/ABF geni su većinom redundantni u pogledu tkivno-specifične ekspresije, bilo u vegetativnim tkivima ili u semenima. U vegetativnim

tkivima preovlađuje ekspresija *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* i *ABF3*, dok su *ABI5* i *EEL* eksprimirani tokom sazrevanja i klijanja semena. Ekspresija *OsABI5* je indukovana ABA i visokim koncentracijama soli, ali ujedno njegovu ekspresiju u klijancima smanjuju suša i hladnoća. Ekspresija *ZmbZIP17* indukovana je dehidratacijom, toplotom, ABA i NaCl kod klijanaca kukuruza (Lata *et al.*, 2011a). Prekomerna ekspresija *ABF3* i *ABF4* dovodi do redukcije transpiracije i omogućava otpornost prema suši (Kang *et al.*, 2002). *AREB1/ABF2* predstavljaju glavne komponente u signalnoj transdukciji posredovanoj glukozom, a prekomerna ekspresija ovog proteina omogućava otpornost prema suši (Kim *et al.*, 2004). Takođe, prekomerna ekspresija *OsZIP23*, člana AREB subfamilije, značajno povećava otpornost prema suši i salinitetu kod transgenog pirinča u reproduktivnoj fazi (Xiang *et al.*, 2008). Prekomerna konstitutivne forme *AREB1* u transgenoj biljci *A. thaliana* dovodi do hipersenzitivnosti na ABA i povećava otpornost prema suši, a dovodi i do povećanja ekspresije *LEA* gena, kao i linker histona H1 i AAA-ATP-aze. Prekomerna ekspresija *AtZIP60* povećava otpornost na salinitet (Umezawa *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2007).

MYC/MYB regulon

MYC/MYB familija proteina je karakteristična za biljne i animalne sisteme, a članovi ove familije imaju različite funkcije. Ovi transkripcioni faktori učestvuju u signalizaciji posredovanoj ABA i dovode do aktiviranja gena uključenih u odgovor na abiotički stres (Lata *et al.*, 2011a). Prvi identifikovan gen je *v-MYB* gen ptičjeg mijeloblastoma virusa-AMV (Klempnauer *et al.*, 1982), dok je prvi biljni *MYB* gen, *C1*, identifikovan kod kukuruza. On kodira transkripcioni faktor, sličan c-MYB, uključen u biosintezu antocijanina (Paz-Ares *et al.*, 1987). Velika raznolikost transkripcionih faktora iz ove grupe, kao i njihova zastupljenost kod različitih organizama ukazuju na njihovu evolutivnu očuvanost i starost. MYB domen se sastoji od jednog do tri imperfektna ponovka, svaki od 52 aminokiseline, koje zauzimaju „*helix-turn-helix*“ konformaciju, smeštajući se u veliki žljeb molekula DNK (Yanhui *et al.*, 2006). Kod biljaka MYB proteini su razvrstani u 3 glavne klase: 1) R2R3-MYB, sa dva susedna ponovka; 2) R1R2R3-MYB, sa tri susedna ponovka i 3) proteini slični MYB, sa samo jednim MYB

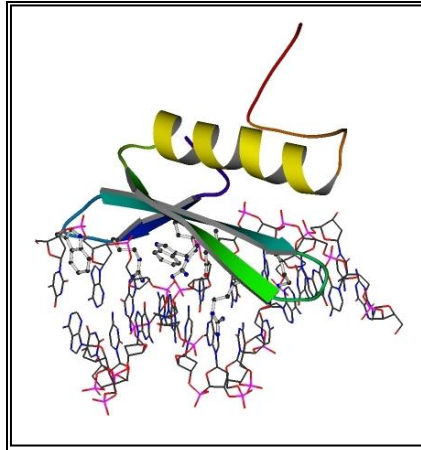
ponovkom. R2R3 grupa sadrži veliki broj gena - u genomu *A. thaliana* postoji 198, dok kod pirinča 183 MYB gena iz te grupe (Lata *et al.*, 2011a). Transkripcioni faktori iz grupe MYB imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima, bilo u normalnim uslovima ili u uslovima abiotičkog stresa, kao i u metabolizmu sekundarnih metabolita, ćelijskoj morfogenezi, formiranju meristema, razviću cveta i semena (Jin and Martin, 1999; Chen *et al.*, 2006; Yanhui *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2003; Araki *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2004). Proteini iz MYB i MYC grupe se akumuliraju jedino nakon akumulacije ABA; kod *A. thaliana* je pokazano da su neki proteini iz ove grupe konstitutivno ekspimirani u svim organima u normalnim fiziološkim uslovima, kao i tokom stresa (Yanhui *et al.*, 2006). AtMYB2 i AtMYC2 funkcionišu kao transkripcioni aktivatori i aktiviraju ekspresiju *RD22* tokom dehidracije i tretmana fitohormonom ABA (Abe *et al.*, 2003). *AtMYB102* učestvuje u odgovoru na dehidraciju, salinitet, aplikaciju ABA i povrede (Denekamp and Smeekens, 2003). *AtMYB60* uključen je u otvaranje stoma indukovano svetlošću, dok je *AtMYB61* uključen u zatvaranje stoma u mraku (Cominelli *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005). *AtMYB44* doprinosi toleranciji na abiotički stres tako što indukuje zatvaranje stoma na ABA nezavisan način (Jung *et al.*, 2008). Nedavna istraživanja pokazala su da je *AtMYB15* ekspimiran u vegetativnim i reproduktivnim organima, a da se njegova zastupljenost povećava tokom izlaganja niskim temperaturama i visokoj koncentraciji soli. Takođe je pokazano da ima mogućnost da suprimira ekspresiju *CBF* gena (Agarwal *et al.*, 2006). Kod soje je do sada identifikovano 156 MYB gena, a kod 43 je pokazano da se ekspresija menja nakon tretmana ABA, solima, dehidracijom i niskim temperaturama (Liao *et al.*, 2008). Prekomerna ekspresija *MYB15* dovodi do povećanja otpornosti na sušu i soli kod *A. thaliana* (Ding *et al.*, 2009). Transgene biljke koje ekspimiraju *AtMYB41* ispoljavaju „dwarf“ fenotip usled promena u ekspanziji ćelija i integritetu kutikule, kao i pojačanu senzitivost na sušu (Cominelli *et al.*, 2008). Prekomerna ekspresija *AtMYB75* i *AtMYB90* dovodi do povećanja nivoa antocijanina (Borevitz *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2006). Sa druge strane, kod pirinča, *OsMYB3R-2* transgene biljke pokazuju povećanu otpornost na hladnoću, sušu i stres solima, kao i smanjenu senzitivnost na ABA (Dai *et al.*, 2007). Nivoi tolerancije postignuti prekomernom ekspresijom *OsMYB4* zavise od biljke koja je transformisana. Ukoliko se radi o *A. thaliana*, transgene biljke su otporne na smrzavanje i hladnoću, uz postojanje „dwarf“ fenotipa; transgeni paradajz je otporan

na dehidraciju, dok su transgene jabuke otporne na niske temperature (Vannini *et al.*, 2004; Vannini *et al.*, 2007; Pasquali *et al.*, 2008). Prekomerna ekspresija *StMYB1R-1* kod krompira dovodi do otpornosti na sušu, bez efekta na ostale agronomske karakteristike biljke (Shin *et al.*, 2011).

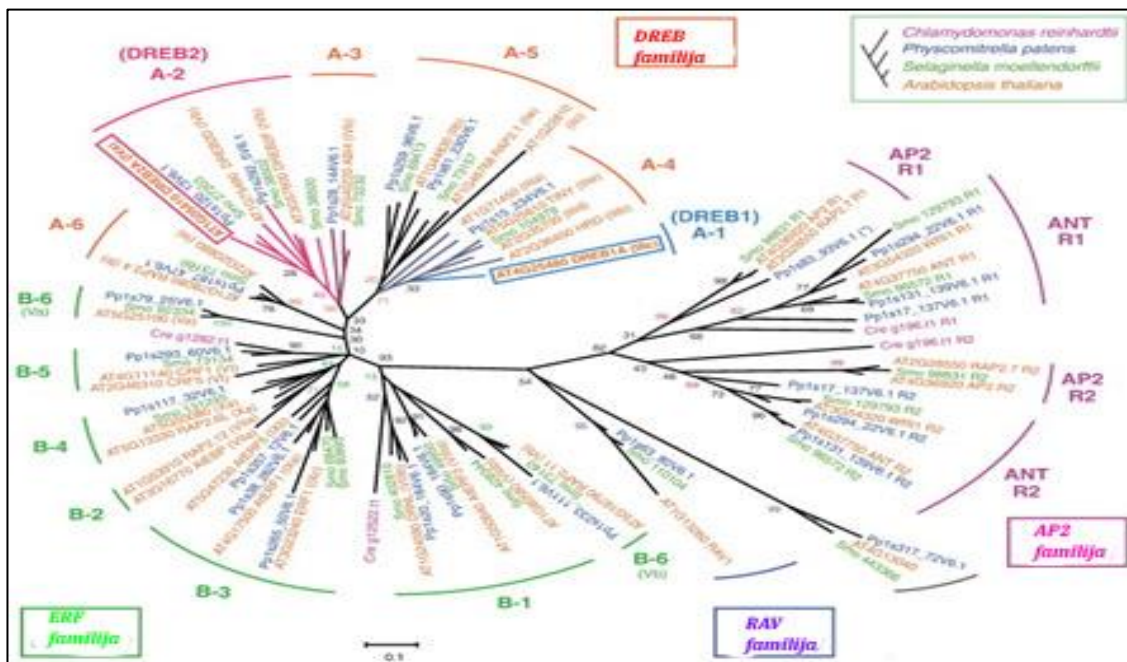
CBF/DREB regulon

DREB proteini (*d*ehydration *r*esponsive *e*lement *b*inding protein) predstavljaju vrlo značajnu grupu transkripcionih faktora iz familije AP2-ERF. Oni indukuju ekspresiju niza gena uključenih u odgovor na abiotički stres, doprinoseći na taj način povećanju otpornosti biljaka na faktore stresa (Lata and Prasad, 2011). Ovi proteini imaju bitnu ulogu u ABA-nezavisnom putu, aktivirajući na taj način specifične gene. Prvi izolovani DRE-vezujući proteini - CBF1 (*CRT binding factor 1*), DREB1A i DREB2A identifikovani su upotrebom jednohibridnog sistema kvasca (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Ovi proteini se specifično vežu za DRE sekvencu (5'-TACCGACAT-3') u okviru promotora target gena i na taj način indukuju njihovu ekspresiju, a ovaj regulatorni *cis* element je prvi put uočen u promotoru *RD29A* gena, koga aktivira suša (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993). DREB1A se preferencijalno vezuje za A/GCCGACNT sekvencu u okviru promotora target gena, dok se DREB2A vezuje za ACCGAC (Mizoi *et al.*, 2012). DREB1 i DREB2 su dve glavne podgrupe u okviru DREB podfamilije, uključene u dva različita signalna puta – odgovor na niske temperature (DREB1) i na dehidraciju (DREB2). *DREB1B/CBF1*, *DREB1A/CBF3* i *DREB1C/CBF2* su locirani na hromozomu 4 *A. thaliana* (Liu *et al.*, 1998). *DREB1/DREB2*-homolgni geni su takođe identifikovani kod ostalih biljnih vrsta (Lata *et al.*, 2011b). Transkripcioni faktori iz grupe DREB sadrže veoma konzervisani AP2/ERF DNK-vezujući domen (Slika 5). Ovaj domen se sastoji iz 3 β-ploče i jednog α heliksa koji su gotovo paralelno postavljeni, a interakcija sa DNK molekulom se odvija preko Arg i Trp ostataka lociranih u β ploči (Mangani *et al.*, 2004). Dve konzervisane aminokiseline - Val i Glu na specifičnim pozicijama u okviru DNK vezujućeg domena (pozicije Val₁₄ i Gly₁₉), predstavljaju ključna mesta za vezivanje DREB proteina za DRE sekvencu u okviru promotora (Liu *et al.*, 1998). Bazni N-

terminalni region proteina poseduje sekvencu za lokalizaciju u nukleus (NLS) i konzervisani region bogat Ser/Thr, koji je ujedno i mesto fosforilacije. Ovi proteini sadrže kiseli C terminalni region, koji može imati *trans*-aktivacionu aktivnost (Stockinger *et al.*,1997; Agarwal *et al.*, 2006).



Slika 5. AP2 domen (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/mda201/projects/gcc.html>).

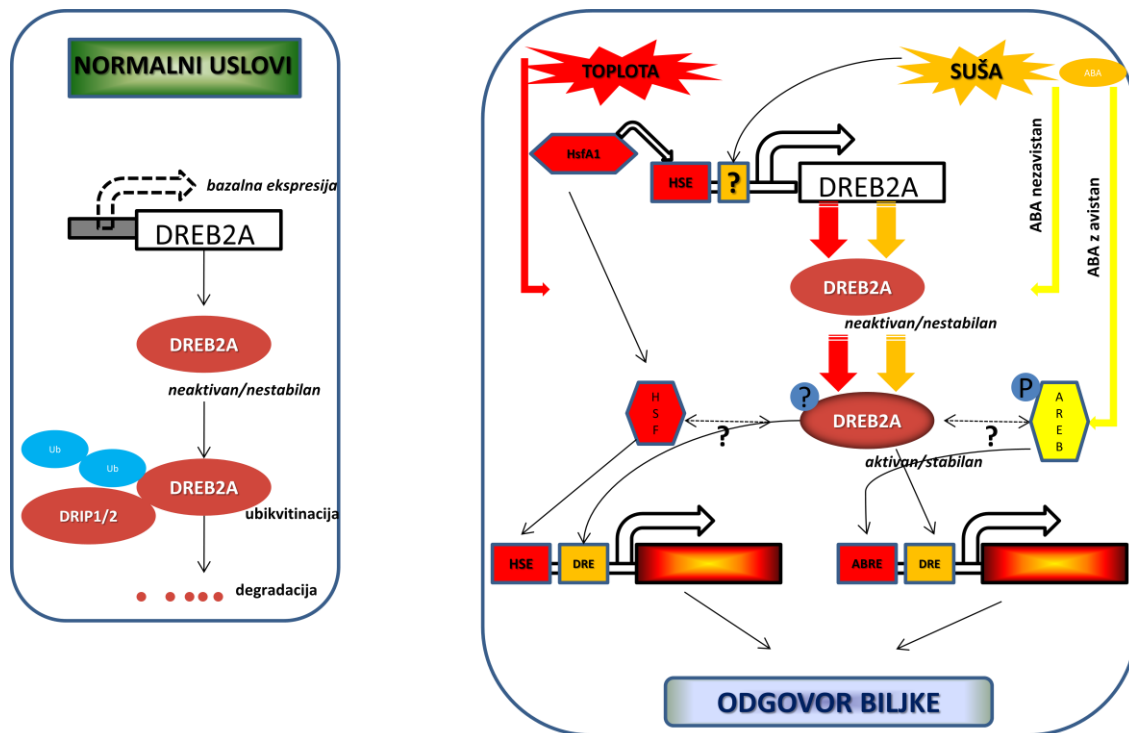


Slika 6. Filogenetsko stablo AP2/ERF familije TF kod biljaka (Mizoi *et al.*, 2012)

Geni za ove TF su tkivno-specifični i nivo njihove ekspresije zavisi od intenziteta stresa koji je primenjen. Tako je, na primer, ekspresija *AhDREB1* kikirikija indukovana

stresom solima, ali samo u korenu, dok nema promene u nivou ekspresije u listovima (Shen et al., 2003). Sa druge strane, *OsDREB1F* pirinča je konstitutivno ekspimiran u svim delovima biljke, sa najvišom ekspresijom u panikulama i kalusima (Wang et al., 2008). *AtDREB2A* arabidopsisa se akumulira u korenu, stablu i listovima u normalnim, fiziološkim uslovima (Liu et al., 1998). *DREB2C* iste vrste se ekspimirira u embrionu i kotiledonima (Lee et al., 2010). Kod suncokreta *HaDREB2* je ekspimiran u svim vegetativnim tkivima, dok se kod hrizanteme *DvDREB2A* ekspimirira u svim organima pod normalnim uslovima sredine (Almoguera et al., 2009; Liu et al., 2008). *AtDREB1* se ekspimirira u *A. thaliana* nakon 10 minuta od izlaganja temperaturi od 4°C, dok se transkripti *CBF1* gena akumuliraju posle 30 minuta od izlaganja temperaturi od 4°C, a maksimalni nivo dostiže nakon 1 sata (Mendina et al., 1999). *HvDREB1* ječma se ekspimirira u listovima pod dejstvom suše, soli i niske temperature (Xu et al., 2009). Kod pirinča, ekspresija *OsDREB1A* i *OsDREB1B* je indukovana niskom temperaturom, ali ne i tretmanom ABA. *OsDREB1A* se ekspimirira i nakon 5 sati od izlaganja visokim koncentracijama natrijum hlorida, a za razliku od njega *OsDREB1C* je konstitutivno ekspimiran (Dubouzet et al., 2003). Ekspresija *DREB2A* i njegovog homologa *DREB2B* kod *A. thaliana* je indukovana dehidratacijom, solima i povredama tkiva, ali ne i niskim temperaturama i ABA. U slučaju *DREB2C*, ABA, manitol i niske temperature skoro i da nemaju efekat na njegovu ekspresiju (Nakashima et al., 2000; Lee et al., 2010). Detaljna istraživanja na 5 *DREB2A* gena pirinča pokazala su da su ekspimirani u znatnoj meri pod normalnim fiziološkim uslovima, ali i da suša, soli i visoke temperature dodatno povećavaju nivo ekspresije, što nije slučaj ukoliko se biljke izlože niskim temperaturama (Matsukura et al., 2010). Kod nekih biljaka, kao što su kukuruz i pšenica, određeni članovi *DREB1* i *DREB2* grupe se ekspimiraju dejstvom niske temperature (Agarwal et al., 2007; Qin et al., 2007; Lata et al., 2011a). Transgene biljke *A. thaliana* koje prekomerno ekspimiraju *DREB1B/CBF1* ili *DREB1A/CBF3* pokazuju značajnu otpornost prema smrzavanju, suši i visokim koncentracijama natrijum hlorida, ukazujući na taj način da *DREB/CBF* proteini mogu aktivirati set različitih gena (Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999). Takve transgene biljke akumuliraju prolin i druge osmoprotektante i pod normalnim uslovima živone sredine (Gilmour et al., 2000). Kod pirinča konstitutivne ekspresija *CBF3/DREB1A* i *ABF3* dovodi do povećane otpornosti transgenih biljaka na sušu i soli, bez promena u rastu i

bez fenotipskih anomalija (Oh *et al.*, 2005). Transgene biljke duvana koje overekspimiraju *CAP2* pokazuju bolji rast i razvće, kao i otpornost na osmotski stres (Shukla *et al.*, 2009). Ukoliko se istim genom transformiše kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, on pokazuje povećanu otpornost na visoke temperature, uz istovremeno povećanje ekspresije Hsf1 (heat shock factor 1). Target ovog proteina je protein toplotnog stresa HSP104, što ukazuje na postojanje evolutivne konzerviranosti mehanizama odgovora na stres (Shukla *et al.*, 2009). Takođe, rekombinantna *E.coli* koja eksprimira *SbDREB2A* pokazuje bolji rast u bazalnom LB (Luria Broth) medijumu, kao i u LB medijumu sa dodatkom natrijum hlorida, PEG i manitola (Gupta *et al.*, 2010). Smatra se da je post-translaciona regulacija DREB2A kod *A. thaliana* ključna za stabilizaciju proteina (Slika 7). NRD (negativni regulatorni domen) kod DREB2A proteina je region bogat serinskim i treoninskim ostacima, hidrofilan je, i predstavlja potencijalnu PEST sekvencu, koja je karakterističan motiv prisutan u nestabilnim proteinima eukariota (Mizoi *et al.*, 2012). U eksperimentima na *Pennisetum glaucum* (Agarwal *et al.*, 2007) pokazano je da je fosforilacija PgDREB2A još jedan od mehanizama regulacije aktivnosti ovog transkripcionog faktora. Fosforilacija Thr ostataka redukuje vezujuću aktivnost PgDREB2A. Sakuma i saradnici (2006) su izolovali DRIP1 i DRIP2 proteine (**DREB2A-Interacting proteins**), koji su homolozi RING E3 ubikvitin ligazi. Ovi proteini stupaju u interakcije sa DREB2A u nukleusu, i posreduju u ubikvitinaciji ovog transkripcionog faktora. Imajući ovo u vidu, može se reći da su DRIP proteini negativni regulatori ekspresije gena indukovanih dehidratacijom, ubrzavajući ubikvitinaciju i degradaciju DREB2A proteina. Dosadašnja ispitivnja ukazuju na to da su DREB proteini značajna grupa transkripcionih faktora koji regulišu kompleksne odgovore biljaka na abiotički stres.



Slika 7. Transkripciona i post-translaciona regulacija DREB2A kod *A. thaliana* (Mizoi *et al.*, 2012, modifikovano)

NAC (NAM, ATAF i CUC) i ZF-HD regulon

NAC familija transkripcionih faktora, specifičnih za biljke, predstavlja jednu od najvećih u biljnom genomu, sa 106 članova kod *A. thaliana* i 149 kod pirinča (Gong *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2005). Ova familija sadrži visoko konzervisan N-terminalni DNK vezujući domen i različit C-terminalni domen (Hu *et al.*, 2008). Naziv ove familije je izveden iz naziva članova grupe koji su prvi otkriveni - NAM (*no apical meristem*), ATAF1-2 i CUC2 (*cup-shaped cotyledon*) (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997). Regulatorni *cis* element za koga se vežu ovi transkripcioni faktori - NACRS (*NAC recognized sequence*) je identifikovan kod arabidopsisa (Tran *et al.*, 2004). Brojna istraživanja su potvrdila ulogu ovih proteina u razviću biljaka i otpornosti prema nekim bolestima (Weir *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007). Za nekoliko članova ove familije, kao što su *ANAC019*, *ANAC055* i *ANAC072*, pokazano je da su uključeni u odgovor na abiotički stres (Hegedus *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2004).

SNAC1 se predominantno eksprimira u „guard“ ćelijama tokom dehidracije (Hu *et al.*, 2006). *AtNAP* i njegovi homolozi imaju bitnu ulogu u procesu senescencije kod *A. thaliana* (Guo and Gan, 2006). Analiza promotora *ERD1* gena potvrdila je da su proteini iz grupe NAC i ZF-HD vrlo bitni za aktivaciju ovog gena (Tran *et al.*, 2007). *XND1* gen je eksprimiran u ksilemu i povezan je sa stresom, odgovorom na ABA i sa senescencijom kod arabidopsisa (Zhao *et al.*, 2008). Kod soje je do sada identifikovano više od 100 proteina koji u sebi sadrže NAC domen, a koji su uključeni u odgovor na abiotički stres i ćelijsku smrt. Neke od tih gena indukuje ABA, osmotski stres ili jasmonska kiselina (Pinheiro *et al.*, 2009). Tranzijentna ekspresija *GmNAC1*, *GmNAC5* i *GmNAC6* u duvanu dovodi do ćelijske smrti i povećane ekspresije markera senescencije. *ANAC078* reguliše biosintezu flavonoida pod dejstvom svetlosti velikog intenziteta (Morishita *et al.*, 2009). Kod pirinča *ONAC045* je indukovano osmotskim stresom, ABA i niskim temperaturama kako u listovima, tako i u korenu (Zheng *et al.*, 2009). Upotrebom „cDNA microarray metode“ utvđeni su neki od target gena transkripcionih faktora iz NAC familije, kao što su *UGS5* i *SNAC1*. Overekspresija *XND1* dovodi do ubrzavanja ćelijske smrti. Uopšte uzev, transkripcioni faktori iz NAC familije imaju bitnu ulogu u fiziološkoj adaptaciji biljaka na promenljive uslove životne sredine (Lata *et al.*, 2011a).

Ostali transkripcioni faktori uključeni u odgovor na stres

Osim transkripcionih faktora koji pripadaju navedenim grupama, koje su ujedno i najrasprostranjeniji, postoji veliki broj ostalih proteina koji su uključeni u regulaciju odgovora biljaka na abiotički stres. Nova klasa transkripcionih faktora sa homeodomenom su HOS (**h**igher expression of **o**smotically responsive), i to pre svih HOS9 i HOS10, proteini slični R2R3 tipu proteina iz MYB familije. Ovi proteini učestvuju u odgovoru biljaka na niske temperature. Mutanti *hos9* i *hos10* pokazuju hipersenzitivnost na niske temperature, ali istovremeno dovode do povećanja ekspresije *RD29A* i drugih gena indukovanih niskim temperaturama, i to bez promena u CBF/DREB1 regulonu. Ovo ukazuje na njihovu ulogu negativnih regulatora ekspresije gena indukovanih hladnoćom (Lata *et al.*, 2011a; Zhu *et al.*, 2005). *HDG11* kodira HD-

START protein, koji ima značajnu ulogu u otpornosti na dehidraciju, regulišući homeostazu vode u biljnim tkivima (Yu *et al.*, 2008). *HARDY (HRD)* gen kodira transkripcioni faktor iz grupe AP2-EREBP IIIc koji je eksprimiran u cvetovima u razvoju, i ima ulogu u zaštiti od desikacije (Nakano *et al.*, 2006). Biljke pirinča koje prekomerno eksprimiraju *HRD* pokazuju povećanu otpornost na sušu i na salinitet (Karaba *et al.*, 2007). ERF proteini (*ethylene responsive factor*) takođe pripadaju AP2-EREBP klasi proteina i uključeni su u rast, razviće, regulaciju metabolizma, kao i u odgovor na abiotički i biotički stres (Hussain *et al.*, 2011). Transgeni duvan koji eksprimira *SodERF3* pokazuje izrazitu otpornost na sušu i visoke koncentracije soli (Trujillo *et al.*, 2008). Takođe, transgeni duvan koji eksprimira gen soje *GmERF3* pokazuje otpornost ne samo prema povećanom salinitetu i suši, već i prema različitim patogenima, ukazujući na značajnu ulogu proteina u signalizaciji u abiotičkom i biotičkom stresu (Zhang *et al.*, 2009).

WRKY predstavljaju jednu od bitnih grupa transkripcionih faktora sa brojnim funkcijama kod biljaka. Kod pirinča ekspresiju *OsWRKY45* indukuje dehidracija, hladnoća, povećana temperatura, kao i natrijum hlorid. Neka istraživanja ukazuju da *OsWRKY45* pirinča može biti uključen u biosintezu ABA, što kao rezultat ima smanjenje transpiracije i otpornost na dehidraciju. Prekomerna ekspresija ovog proteina kod pirinča dovodi do inhibicije rasta na ranim stadijumima razvića, dok su sa druge strane takve biljke otporne na UV zračenje i infekcije patogenima (Wang *et al.*, 2007; Qiu and Yu, 2009). Transgeni arabidopsis koji overekspimiraju *GmWRKY21* soje je tolerantan na hladnoću, dok biljke koje overekspimiraju *GmWRKY54* pokazuju tolerantnost na dehidraciju i salinitet, najverovatnije preko regulacije *DREB2A* i *STZ/Zat10*. Sa druge strane, biljke koje overekspimiraju *GmWRKY13* pokazuju povećanu senzitivnosti na salinitet i stres indukovani manitolom, smanjenu senzitivnost na ABA, kao i povećanje broja bočnih korenova (Lata *et al.*, 2011a).

ZFP proteini (*zinc finger*) su grupa proteina od velikog značaja u biljnom i životinjskom svetu. Ovi proteini sadrže motive u kojima se cisteinski i/ili histidinski ostaci vežu za atom cinka formirajući na taj način lokalne peptidne strukture neophodne za specifične funkcije (Singh *et al.*, 2010). Cys2/His2 (C2H2) tip ZFP sadrži EAR represorski domen i ima bitnu ulogu u regulaciji odgovora biljaka na

abiotički i biotički stres. Prekomerna ekspresija *Alfin1*, novog člana ZFP familije proteina, obezbeđuje povećanu otpornost biljaka na natrijum hlorid (Winicov and Bastola, 1999). Neki od proteina iz grupe ZFP su inducibilni niskim i visokim temperaturama, teškim metalima ili povređivanjem, a njihova overekspresija može uticati na povećanje otpornost biljaka na faktore kako abiotičkog, tako i biotičkog stresa (Kim *et al.*, 2010). Prekomerna ekspresija *CaZF*, jednog od članova C2H2 ZFP grupe transkripcionih faktora, dovodi do povećanja otpornosti na salinitet. Interesantan je podatak da ekspresija ovog gena u heterelognom sistemu obezbeđuje tolerantnost kvasca na osmotski stres kroz signalni put u koji su uključeni Hog1p i kalcineurin (Jain *et al.*, 2009).

Mikro RNK

Mikro RNK (miRNAs) predstavljaju klasu RNK molekula, dugih 19-24 nukleotida, koje deluju kao specifični regulatori ekspresije eukariotskih gena. Ovi molekuli su otkriveni kod *C. elegans* (Ambros and Chen, 2007), od kada počinje njihovo detaljno ispitivanje kao jednih od bitnih regulatornih elemenata u kontroli ekspresije gena kod biljaka i životinja. Smatra se da je skoro 30% genoma eukariota pod kontrolom ovih molekula (Axtell, 2008). Mikro RNK su hemijski i funkcionalno slične sa siRNK (short interfering RNA) te razlikovanje ovih klasa RNK postaje sve teže sa novim istraživanjima i saznanjima (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Voinnet, 2009). Mikro RNK, slično kao i siRNK, regulišu transkripciju gena preko mehanizma poznatog kao post-transkripciono utišavanje gena (PTGS - *Post Transcriptional Gene Silencing*).

Biogeneza mikro RNK biljaka

Formiranje funkcionalnog molekula miRNK uključuje četiri osnovna koraka: (1) indukciju obrade miRNK od strane dvolančane RNK (dsRNA), (2) obradu dvolančane RNK u male RNK molekule (sRNAs), (3) 3'-O'- metilacija malih RNK, i (4) inkorporacija metilovanih molekula u efektorni kompleks za utišavanje (Slika 8).

Efektorni kompleks za utišavanje interaguje sa odgovarajućim targetima preko komplementarnosti, bilo da se radi o delimičnoj ili kompletnoj komplementarnosti. Smatra se da se biljne miRNK transkribuju iz regiona genoma koji ne kodiraju proteine, kao i da se transkribuju sa sopstvenih gena (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). U nekim slučajevima, kao što je miR395 klaster, geni za miRNK su grupisani u klastere i više miRNK se transkribuje iz jednog primarnog transkripta (Gudetti *et al.*, 2005). RNK polimeraza 2 transkribuje gen za odgovarajuću miRNK, a nastali primarni transkript (pri-miRNK) se karakteriše prisustvom petlje, odnosno „stem-loop” strukture (Xie *et al.*, 2005). Neki od nastalih primarnih transkripata mogu sadržati „kapu“ na svom kraju, mogu biti adenilovani ili podvrgnuti alternativnom iskrajanju (Aukerman and Sakai, 2003; Xie *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006). Osim RNK polimeraze 2, transkripciju gena za miRNK može vršiti i virusna RNK polimeraza ili RNK zavisna polimeraza 1-6 (RDR 1-6). Ovakve polimeraze transkribuju atipične molekule ili transkripte RNK polimeraze 4, koja je specifična za biljke (Voinnet, 2009).

Pri-miRNK veličine do 1 kb, sa strukturom petlje, dalje se obrađuje i iseca delovanjem endonukleaze iz klase RNaza 3, kao što je Dicer. Kod *A. thaliana* postoje četiri tipa proteina sličnih Dicer endonukleazi (DCL). Ovi proteini daju produkte koji se međusobno razlikuju u dužini; produkti DCL1 su dužine 18-21 nukleotid, DCL2 produkti imaju 22 nukleotida, DCL3 imaju 24 nukleotida, dok su DCL4 produkti dužine 21 nukleotid (Voinnet, 2009). Svi produkti DCL proteina karakteriše prosustvo petlje na 3' kraju, i ova karakteristika se često koristi u analizi podataka dobijenih sekvenciranjem, a u cilju determinacije potencijalnih miRNK (Lee *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003). Kod biljaka je aktivnost DCL1 dovoljna za akumulaciju miRNK i formiranje zrelih molekula miRNK u nukleusu (Park *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006). Kod biljaka ostali DCL proteini nisu neophodni za biogenezu miRNK (Xie *et al.*, 2004). Za razliku od biljaka, kod životinja postoje dva različita koraka u obradi miRNK transkripta. Najpre se pre-miRNK molekul formira od pri-miRNK, što je praćeno formiranjem miRNK/miRNK* dupleksa u citoplazmi (Lee *et al.*, 2003). Za razliku od životinja, pre-miRNK se retko detektuju kod biljaka i obe reakcije obrade, odnosno sečenja prekursora se odvijaju u nukleusu. Pokazano je da je sekundarna struktura pri-miRNK bitna za obradu prekursora, a što je potvrđeno u eksperimentima gde je

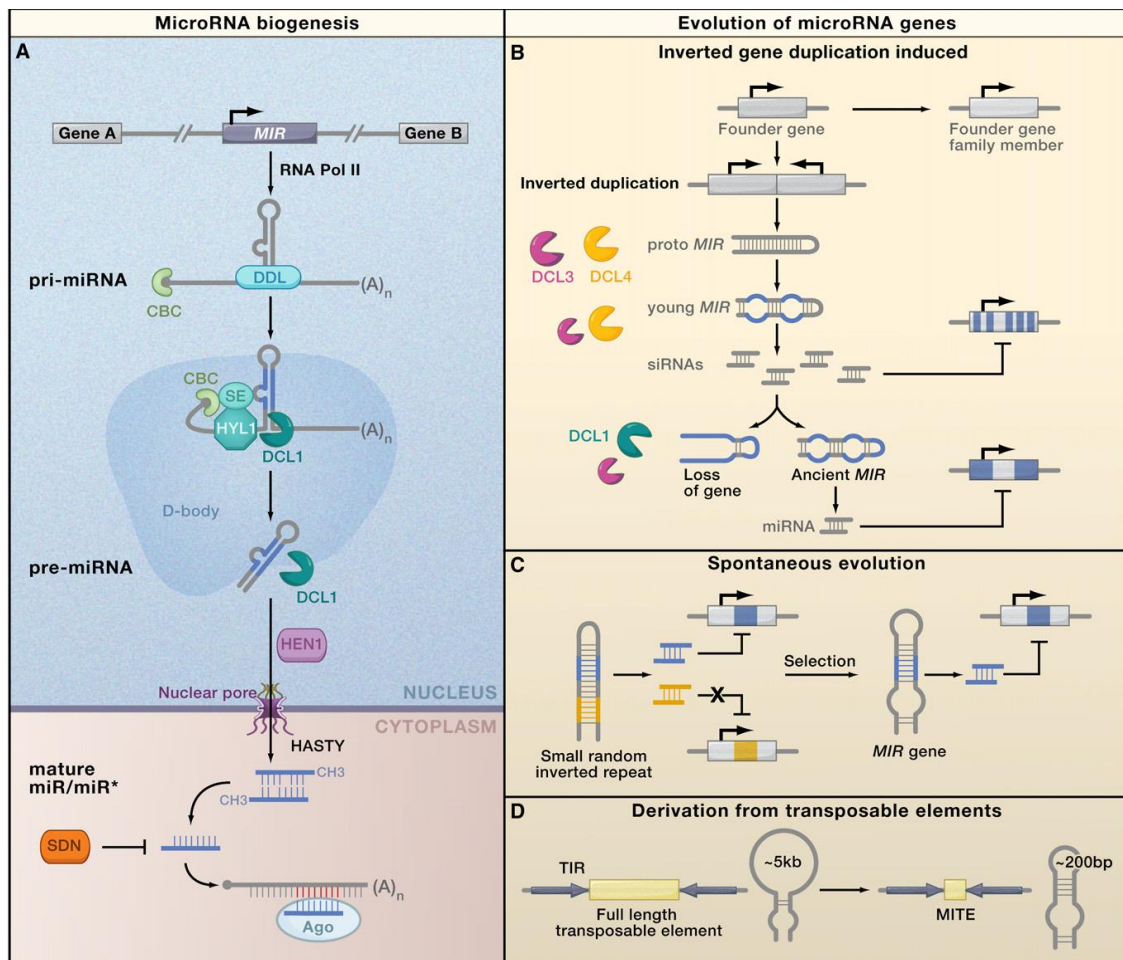
sekvenca pri-miRNK promenjena bez uticaja na strukturu petlje (Parizotto *et al.*, 2004; Vaucheret *et al.*, 2004). DCL1 interaguje sa HYL1 (hyponastic leaves 1) i sa SE (serrate) proteinom, a u cilju obezbeđivanja nukleazne aktivnosti. Mutanti za ove gene su letalni, kao i DCL1 mutanti (Kurihara *et al.*, 2006; Fang and Spector, 2007). DCL1 interaguje sa DDL (dawdle) proteinom čija funkcija do sada još nije utvrđena (Yu *et al.*, 2008).

Treći korak u biogenezi miRNK je 3'-O-metilacija miRNK dupleksa. S-adenozilmetionin zavisna metiltransferaza HEN1 (Hua Enhancer 1) katalizuje metilaciju svih malih nekodirajućih RNK kod biljaka. Metilacija sprečava 3'-uridilaciju i samim tim degradaciju malih RNK (Li *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006).

Poslednji korak u obradi miRNK je transport miRNK iz nukleusa u citoplazmu i ugrađivanje u kompleks za utišavanje. Za eksport miRNK iz nukleusa u citoplazmu neophodan je HST (hasty) protein. Kompletan mehanizam transporta je nepoznat, ali se smatra da je HST homolog animalnom eksportinu 5, a pokazano je da neke miRNK interaguju sa HST. Međutim, podaci koji su dobijeni na „null“ mutantima HST koji akumuliraju miRNK, ukazuju i na mogućnost postojanja mehanizma eksporta miRNK iz nukleusa koji je nezavisan od HST (Poethig *et al.*, 2006)..

Jedan od lanaca iz miRNK/miRNK* dupleksa se inkorporira u utišavajući kompleks indukovani RNK - RISC (**R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex), a u cilju obezbeđivanja efektorske funkcije kompleksa. Selekciju koji će od lanaca biti ugrađeni u kompleks određuje energetska asimetrija dupleksa miRNK/miRNK* (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). U miRNK molekulu 5' kraj je nestabilniji nego isti kraj u miRNK* molekulu, zbog čega se i ugrađuje u RISC (Haley and Zamore, 2004). Slobodni miRNK* molekul se ubrzo degraduje nakon ugrađivanja miRNK molekula u RISC. Jedan od sastavnih delova RISC kompleksa je Argonaut protein AGO. Ovi proteini sadže PAZ domen, koji je odgovoran za vezivanje jednolančane RNK, i PIWI domen sa nukleaznom aktinošću poput RNaze H (Brodersen and Voinnet, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Kod *A. thaliana* je identifikovano 10 Argonaut proteina, od kojih su 4 funkcionalno okarakterisani. AGO4 učestvuje u metilaciji nekih transpozona i invertovanih ponovaka u genima (Xie *et al.*, 2004). AGO7 i AGO10 imaju ključnu ulogu u razviću *A. thaliana*,

ali način na koji ovi proteini deluju još uvek nije poznat (Poethig *et al.*, 2006). AGO7 učestvuje u biogenezi ta-siRNK (trans acting small interfering RNA) (Vazquez *et al.*, 2004). AGO6 je uključen u metilaciju citozina i asociranje sa 24 nukleotida dugim molekulom RNK u heterohromatinu (Mallory and Vaucheret, 2010). Jedini od AGO proteina koji učestvuje u PTGS je AGO1. Ovaj protein katalizuje sečenje targeta miRNK molekula, a *ago1* mutanti pokazuju povećanu akumulaciju targeta za odgovarajuće miRNK (Vaucheret *et al.*, 2004).



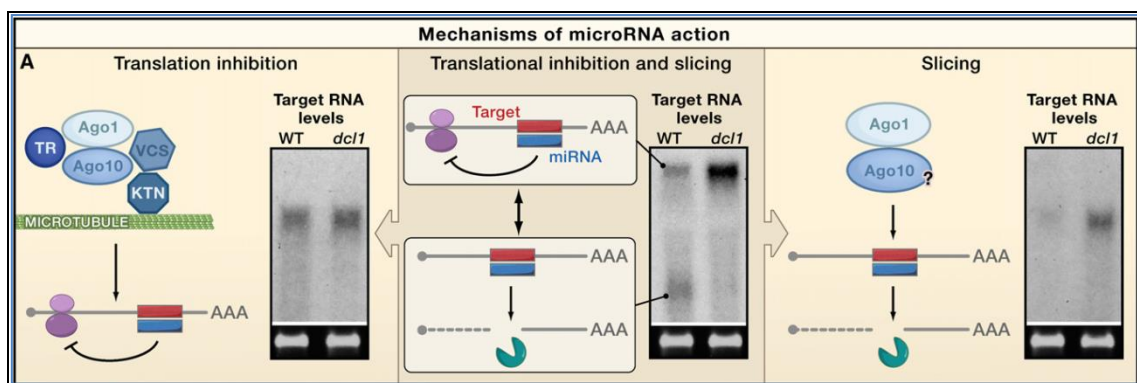
Slika 8. Biogeneza miRNK i evolucija miRNK gena (Voinet *et al.*, 2009)

Mehanizam delovanja miRNK biljaka

Mikro RNK regulišu ekspresiju gena na tri različita mehanizma: (a) degradacija komplementarnog molekula iRNK targeta, (b) represija translacije ciljne iRNK, i (c) transkripciono utišavanje ciljne iRNK (Slika 9). Do skoro je degradacija ciljne iRNK pomoću AGO1 proteina bio jedini mehanizam koji je eksperimentalno potvrđen. S obzirom na to da su miRNK biljaka u velikoj meri komplementarne sa ciljnom iRNK, glavni mehanizam delovanja miRNK bio je opisan kroz degradaciju iRNK. Ovo je dokazano u eksperimentima u kojima je kod *ago1*, *hen1* i *hy11* mutanata primećena povećana akumulacija ciljnih iRNK (Boutet *et al.*, 2003; Vaucheret *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004). Takođe, povećana akumulacija targeta je primećena i u ćelijama koje povećano eksprimiraju supresore RNK utišavanja poreklom iz virusa (Kasschau *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Sa druge strane, smanjenje akumulacije ciljne iRNK utvrđeno je u ćelijama koje povećano eksprimiraju miRNK (Palatnik *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Sunkar *et al.*, 2007). Osim toga, korišćenjem metode brze amplifikacije krajeva cDNK (5' RACE) (Palatnik *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005), kao i metode *Northern blot* (Souret *et al.*, 2004) potvrđen je mehanizam degradacije ciljne iRNK preko komplementarnog sparivanja sa 9-11 nukleotida miRNK. Kao dodatna potvrda ovog mehanizma poslužili su i eksperimenti u kojima je potvrđena utišavajuća aktivnost Piwi domena AGO1 proteina (Vaucheret *et al.*, 2004; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; Diederichs and Harber, 2007). Degradacija ciljnih molekula iRNK je po principu mehanizma „prekidača“ - kada se jednom degraduje target ne postoji mogućnost reverzibilne reakcije. Ovakav vid regulacije je veoma bitan u razviću, kada dolazi do permanentne determinacije sudbine određenih ćelija.

Drugi mehanizam delovanja miRNK biljaka, koji je nedavno otkriven, je represija translacije iRNK ciljnih gena (Brodersen et Voinnet, 2009). Ovaj mehanizam je otkriven analiziranjem mutanata (*mad1-6*) kod kojih je bio poremećen mehanizam degradacije targeta putem miRNK. Tako je primećeno da kod biljaka miRNK svoju

aktivnost ispoljavaju i kroz degradaciju targeta i kroz represiju translacije. Glavni faktor koji odlučuje da li će doći do degradacije targeta ili represije translacije jeste stepen komplementarnosti miRNK i odgovarajućeg targeta, ali i da pozicija u kojoj dolazi do komplementarnosti (ORF, 5' UTR ili 3'UTR) nije ključan element koji utiče na aktivnost miRNK. Postojanje represijetranslacije ciljne iRNK je potvrđeno detekcijom kompletnih iRNK targeta korišćenjem *Northern blot* metode (Dunoyer *et al.*, 2004; Souret *et al.*, 2004). Za razliku od mehanizma degradacije targeta, koji je po principu „uključivanje-isključivanje“, mehanizam represije translacije omogućava finu regulaciju količine targeta, i veoma je važan u kontroli negativnih regulatora odgovora na stres. Na taj način je osigurano da će se regulatori odgovora na stres javiti tačno nakon stresa. Ova ideja je potvrđena u slučaju nedostatka fosfata (Sunkar *et al.*, 2007), kao i u slučaju bazalnog odgovora na bakterijsku infekciju (Navarro *et al.*, 2006). Reverzibilnost ovakvih procesa ima evolutivni značaj, jer sprečava smanjenje adaptivne vrednosti jedinke usled dugotrajne aktivacije odgovora na stres (Voinnet 2009).



Slika 9. Mehanizam delovanja miRNK biljaka (Voinet, 2009)

Regulacija aktivnosti miRNK biljaka

Delovanje miRNK biljaka je regulisano na nekoliko nivoa, uključujući kontrolu ekspresije gena za miRNK, obradu miRNK kao i kontrolu aktivnosti miRNK.

Prvi nivo regulacije delovanja miRNK je regulacija transkripcije gena koji kodiraju miRNK. Neki od ovih gena poseduju region sličan TATA bloku, što povećava mogućnost da ovi geni imaju svoje nezavisne promotore (Xie *et al.*, 2005). Takođe, tkivno ili ćelijsko-specifičan obrazac ekspresije konzerviranih gena za miRNK ukazuje na preciznu kontrolu njihove ekspresije (Parizotto *et al.*, 2004; Kawashima *et al.*, 2009). Veliki broj ovih gena u okviru svojih promotora poseduje vezivna mesta za transkripcione faktore kao što su ARF (aktivira ekspresiju gena nezavisno od auksina), LFY (uključen u regulaciju razvića cveta), MYC2 (povećava otpornost na sušu) (Megraw *et al.*, 2006). U okviru gena za ove transkripcione faktore postoje vezivna mesta za pojedine miRNK, što ukazuje na postojanje povratne sprege u regulaciji ekspresije, kao i na kompleksnost transkripcione kontrole (Megraw *et al.*, 2006). Postoje geni koji su paralogni genima za miRNK, a čiji su produkti identične miRNK. Smatralo se da su ovi geni nastali kao posledica duplikacija i da imaju sličan obrazac ekspresije. Međutim, otkriće različitog obrasca ekspresije devet miR166 gena u apeksu korena kukuruza ukazuje da su paralogni geni dobili vezivna mesta za specifične kontrolne elemente i da su regulisani na različite načine (Nogueira *et al.*, 2007).

Regulacija obrade miRNK je drugi vid kontrole delovanja miRNK. Do sada direktnih dokaza za ovakav vid kontrole nema, ali eksperimentalni podaci u kojima je utvrđena nejednaka količina u nivou pri/pre-miRNK i miRNK kod različitih miRNK ukazuje na mogućnost postojanja ovakvog vida regulacije. Kod velikog broja biljnih vrsta identifikovani su molekuli miRNK dugi 24 nukleotida zavisni od DCL3 (Parizotto *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2008). Ovi molekuli su formirani nezavisno od DCL1 i pronađeni su uglavnom u cvetu, što je takođe potvrđeno i višestruko većom zastupljenošću DCL3 u cvetu u odnosu na DCL1. Pokazano je da povećanje ekspresije SINE sekvenci dovodi do sličnih efekata kao i kod mutanata koji su deficitarni u produkciji miRNK. Struktura petlje u okviru SINE podseća na strukturu u okviru prekursora miRNK, i ima sposobnost vezivanja za HYL1 element uključen u obradu

miRNK (Pouch-Pelisser *et al.*, 2008). Tako kompeticija prekursora miRNK i SINE za HYL1 ima važnu ulogu u kontroli tkivno-specifične ekspresije miRNK. Drugi interesantan način kontrole delovanja miRNK je sekvstriranje DCL1 proteina posredstvom miR162. Na taj način različita ekspresija miR162 može modulirati aktivnost miRNK na globalnom nivou (Xie *et al.*, 2003). Na sličan način miR168 kontroliše nivo AGO1 proteina.

Još jedan kompleksan mehanizam kontrole miRNK aktivnosti povezan je sa *IPSI* genom, čija se ekspresija indukuje usled nedostatka fosfata. U okviru ovog gena postoji region komplementaran sa miR399, ali postoji petlja u regionu sečenja. Na taj način se *IPSI* veže za miR399, sprečavajući inhibicioni efekat te miRNK. Ekspresiju miR399 i *IPSI* indukuje nedostatak fosfata, i smatra se da se tako moduliše aktivnost miR399 preko *IPSI* (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007).

Sortiranje miRNK u različite komplekse sa AGO proteinima predstavlja još jedan vid regulacije aktivnosti miRNK. Otkriveno je da nukleotid na 5' kraju vodećeg lanca male RNK određuje u koji će AGO kompleks mala RNK biti ugrađena (Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Tako se AGO1 preferencijalno vezuje za uridin na 5' kraju, dok AGO2 i AGO4 za adenozin, a promena uridina u adenozin remeti aktivnost kompleksa. Postojanje miRNK različitih dužina u različitim tkivima ide u prilog navedenoj ulozi nukleotida na 5' kraju, međutim pravih eksperimentalnih dokaza još uvek nema (Vazquez *et al.*, 2008).

Uloga miRNK u odgovoru biljaka na abiotički stres

Osim u razviću, gde učestvuju u inicijaciji i održavanju meristema, u morfogenezi lista, razviću stoma, odgovoru na svetlost, determinaciji pola, mikro RNK imaju ulogu i u odgovoru biljaka na faktore abiotičkog stresa, ukazujući na značaj post-transkripcione regulacije ekspresije gena u takvim uslovima (Covarrubias and Reyes, 2010). U eksperimentima u kojima su korišćeni klijanci *A. thaliana* identifikovano je niz konzervisanih mikro RNK, a čija se ekspresija menja nakon što su biljke izložene hladnoći, dehidraciji, natrijum hloridu ili hormonu ABA (Sunkar and Zhu, 2004).

Nivo ekspresije nekih od mikro RNK, kao što su miR393, miR397b i miR402 se povećava nakon navedenih tretmana, dok se kod drugih (miR389a) nivo ekspresije smanjuje delovanjem stresa.

Osmotski stres: dehidracija, salinitet i abscisinska kiselina

Dehidracija i stres solima remete osmotski balans u ćeliji i smatra se da slični mehanizmi leže u osnovi odgovora na ova dva tipa faktora (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Rezultati dobijeni na klijancima pirinča, kod kojih je dehidracija uzrokovana tretmanom sa PEG, pokazali su da se nivo ekspresije miR169g, miR393 i miR397b povećava u dehidraciji (Frazier *et al.*, 2011). Sa druge strane, nivo ekspresije miR169 se smanjuje kod odraslih biljaka pirinča kod kojih je redovno zalivanje ukinuto u periodu od nekoliko dana (Zhou *et al.*, 2010). Ovaj podatak ukazuje da regulacija ekspresije mikro RNK zavisi od niza faktora, kao što su stadijum razvića biljke i način na koji je biljka izložena stresu (Jia *et al.*, 2009). Takođe, pokazano je da se u okviru familije miR169, jedino miR169g indukuje tretmanom sa PEG (Zhao *et al.*, 2007). Lu *et al.* (2008) ukazuju da se ekspresija različitih članova određene familije mikro RNK razlikuje u zavisnosti od vrste stresa. Ekspresija članova familije miR169 se menja kod pirinča i arabidopsisa koji su izloženi dejstvu soli, dok se ekspresija miR393 menja pod delovanjem ABA i natrijum hlorida kod pasulja (Zhao *et al.*, 2009; Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Sve ovo ukazuje da ove miRNK mogu imati značajnu ulogu u opštem odgovoru biljaka na osmotski stres.

Targeti za članove familije miR169 su CCAAT-box vezujući faktori (Rhoades *et al.*, 2002), koji su uključeni u odgovor kukuruza na vodni deficit (Nelson *et al.*, 2007). Međutim, ovi proteini su kod kukuruza identifikovani kao pozitivni regulatori odgovora na vodni deficit, a povećanje njihove ekspresije kod transgenih biljaka povećava otpornost kukuruza, kao i prinos (Nelson *et al.*, 2007). Samim tim redukcija ekspresije miR169 bi se očekivala u uslovima dehidracije, ali su eksperimentalni rezultati pokazali drugačije.

Targeti za miR393 su transkripti *TIR1* (Transport Inhibitor Protein 1) gena, koji je uključen u signalne puteve posredovane hormonom auksinom (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Povećanje ekspresije miR393, a samim tim i smanjenje nivoa TIR1 proteina u uslovima stresa, dovodi do redukcije u elongaciji hipokotila i rastu bočnih korenova, a što je i uočeno kod *tir1* mutanata (Ruegger *et al.*, 1998). Osim toga, ekspresiju ove mikro RNK indukuje i infekcija sa *Pseudomonas syringae*, ukazujući na povezanost odgovora na faktore abiotičkog i biotičkog stresa (Navarro *et al.*, 2006).

Kod model leguminoze *Medicago truncatula* pokazano je da se nivo miR408 značajno povećava kako u korenovima, tako i u nadzemnom delu biljaka koje su dehidratirane tokom sedam dana (Trindade *et al.*, 2010). Slično je primećeno i u listovima ječma (*Hordeum vulgare*) nakon 4 i 8 sati dehidratacije (Kantar *et al.*, 2010). Kako su targeti za miR408 transkripti koji su slični transkriptima gena za plantacijanin, smatra se da ova mikro RNK ima ulogu u homeostazi bakra kod biljaka (Abdel-Ghany and Pilon, 2008; Trindade *et al.*, 2010).

Iako postoji povezanost između odgovora na vodni deficit i na stres solima, ipak postoje različiti setovi mikro RNK koje su specifične za jedan ili drugi vid stresa. Tako kod duvana različite koncentracije NaCl smanjuju nivo miR159 i miR167, dok se nivo miR172 i miR396 povećava. Interesantno je da se ekspresija svih navedenih miRNK povećava nakon tretmana sa različitim koncentracijama PEG kod istih biljaka (Frazier *et al.*, 2011). Osim toga, isti autori su pokazali i da koncentracija PEG utiče na nivo ekspresije, pa se smatra da su mikro RNK uglavnom uključene u rani odgovor biljaka na abiotički stres, slično kao i transkripcioni faktori (Zhu, 2002).

Poznato je da tretman biljnim hormonom abscisinska kiselina može indukovati ekspresiju istih gena kao i dehidratacija ili visoke koncentracije soli (Zhu, 2002; Nakashima *et al.*, 2006), ali i da postoje dva puta signalne transdukcije u osmotskom stresu-jedan koji je zavisian od ABA, i drugi ABA nezavisian (Bohnert and Sheveleva, 1998; Nakashima *et al.*, 2006). Tako ABA indukuje ekspresiju miR159, kao i suša (Reye and Chua, 2007).

DRE (Dehydration-responsive elements) i ABRE (ABA-responsive elements), prisutni u promotorima mnogih gena koje indukuje vodni deficit i/ili soli (Nakashima *et al.*,

2006), nađeni su i u regionima uzvodno od *MIR169* gena kod pirinča (Zhao *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). Ovaj podatak ukazuje da, osim regulacije ekspresije brojnih transkripcionih faktora, i mikro RNK same sebe mogu regulisati na transkripcionom nivou. Utvrđeno je da povećanje ekspresije miR169c kod paradajza povećava otpornost na sušu kroz promene u nivou stoma, što je kontrolisano hormonom ABA, kao i redukcijom transpiracije i gubitkom vode (Chinnusamy *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011).

Osim konzervisanih mikro RNK, i nekonzervisane mikro RNK su uključene u odgovor na abiotički stres. Mikro RNK miR1514a i miR2119, koje su specifične za leguminoze, kao i konzervisana miR2118 su indukovane vodnim deficitom i tretmanom ABA (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Interesantno je da je target za miR1514a MnSOD i cistein proteaza, dok je target za miR2119 aldehid dehidrogenaza 1, što podržava hipotezu o ulozi navedenih mikro RNK u različitim tipovima stresa. Ekspresija mikro RNK koje su specifične za biljke iz porodice trava, miR1432 i miR1867, a čiji su targeti fenilalanin tRNK sintaza i protein iz DUF1242 superfamilije, povećava se tokom dehidratacije kod *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (Kantar *et al.*, 2011).

Oksidativni stres

Imajući u vidu da se oksidativni stres javlja kao sekundarni efekat svih tipova abiotičkog stresa, jasno je da će većina konzervisanih mikro RNK menjati svoju ekspresiju kao odgovor na postojanje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Kod pirinča, gde je oksidativni stres izazvan tretmanom vodonik peroksidom, primećeno je povećanje ekspresije konzervisanih miR169, miR397 i miR827, dok se ekspresija miR319a i miR528 smanjuje (Li *et al.*, 2010). Osim toga, identifikovana je i mikro RNK koja je specifična za pirinač, miR1850, a čija je ekspresija indukovana oksidativnim stresom. Ovo je dokaz uloge miRNK kako u opštem odgovoru, tako i u species-specifičnom odgovoru na abiotički stres.

Nivo konzervisane mikro RNK miR398 se smanjuje tokom oksidativnog stresa, a samim tim i tokom stresa izazvanog solima i ozonom, pa čak i tokom infekcije sa *P.*

syringae (Sunkar *et al.*, 2006; Jagadeeswaran *et al.*, 2009). Targeti za ovu mikro RNK su citohrom c oksidaza (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Trinidad *et al.*, 2010) kao i citosolna i plastidna Cu/Zn superoksid dismutaza (CSD1 i CSD2) (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Sunkar *et al.*, 2006). Obe forme superoksid dismutaze vrše konverziju superoksidnog radikala O_2^- u vodonik peroksid (H_2O_2) (Kliebenstein *et al.*, 1998). Dakle, smanjenje nivoa miR398 dovodi do povećanja nivoa CSD transkripta, štiteći na taj način ćelije od oksidativnog stresa (Sunkar *et al.*, 2006). Međutim, u zavisnosti od tipa abiotičkog stresa može doći i do povećanja ekspresije ove mikro RNK. Tako kod *M. truncatula* vodni deficit, kao i tretman PEG-om, dovodi do povećanja nivoa ove mikro RNK (Trinidad *et al.*, 2010; Frazier *et al.*, 2011). Slično je zabeleženo i kod pšenice (Kantar *et al.*, 2011). Interesantno je da ekspresija ove mikro RNK ne zavisi samo od tipa stresa, već i od nivoa primenjenog stresa (Frazier *et al.*, 2011). Osim uloge u abiotičkom stresu, miR398 je povezana i sa održavanjem homeostaze bakra kod biljaka (Abdel-Ghany and Pilon, 2008). Eksperimentalni podaci ukazuju da ekspresija miR398 može biti regulisana na dva različita načina, a sve u cilju zaštite ćelija od oštećenja. Na prvi put utiče nivo bakra u ćelijama, dok je drugi regulisan prisustvom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Smatra se i da indukcija miR398 i degradacija transkripta za proteine koji vezuju bakar, ima za cilj očuvanje nivoa bakra za vitalne procese, kao što je elektron-transportni lanac u fotosintezi (Abdel-Ghany and Pilon, 2008).

Hipoksija

Kod kukuruza je pokazano da hipoksija izazvana potapanjem biljaka u vodu dovodi do promena u ekspresiji određenih mikro RNK. Smatra se da su ove promene zavisne od dužine stresa, kao i da su tranzijentne. Tako dolazi do povećanja ekspresije miR166, miR167 i miR171 u ranim fazama hipoksije, dok se ekspresija miR159 smanjuje na početku tretmana, da bi nakon 24h došlo do povećanja nivoa transkripta miR159 (Zhang *et al.*, 2008). Ove mikro RNK u okviru svojih promotora poseduju *cis* elemente koji su povezani sa odgovorom na anaerobni stres - ARE (anaerobic responsive elements) i GC motive. Slični podaci dobijeni su i u eksperimentima na *A. thaliana*

(Moldovan *et al.*, 2010). Sa izuzetkom miR172, sve navedene mikro RNK imaju sličan profil ekspresije nakon tretmana inhibitorima funkcije mitohondrija, ukazujući na to da su one inducibilne u uslovima hipoksije (Moldovan *et al.*, 2010).

UV zračenje

Kod model biljke *Arabidopsis thaliana*, kao i pamuka, pokazano je da UV zračenje u trajanju od dva sata indukuje ekspresiju miR156, miR160, miR165-167 i miR398, dok se ekspresija miR159 i miR393 ne menja (Zhou *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009). Osim toga, dejstvo UV-B zračenja smanjuje ekspresiju miR169, miR395 i miR472. Ovi rezultati ukazuju da, iako su mnoge mikro RNK konzervisane između različitih vrsta, njihovu ekspresiju može isti stimulus menjati na različite načine.

Kod *A. thaliana* i kod topole (*Populus tremula*) većina od navedenih mikro RNK koje se indukuju UV zračenjem u okviru promotora svojih gena sadrže *cis* elemente koji su indukovani svetlošću, kao što su GT-1 mesto (GGTTAA) i I-box (GATAAGA) (Zhou *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009). Osim pod dejstvom svetlosti, neke od pomenutih mikro RNK mogu biti regulisane i fotoperiodom. Tako se, na primer, transkripti miR167, miR168, miR171 i miR393 akumuliraju kod arabidopsisa dok je biljka pod svetlosnim režimom (smenjivanje dana i noći). Međutim, kod biljaka koje su gajene pod kontinuiranom svetlošću, ovakav profil ekspresije nije zabeležen, ukazujući pre svega na ulogu svetlosnog režima, a ne cirkadijalnog ritma (Sire *et al.*, 2009).

Niske temperature

Imajući u vidu činjenicu da niske temperature dovode do poremećaja metaboličkih procesa i da inhibiraju usvajanje vode, nije iznenađujuće da postoji sličnost u odgovoru biljaka na osmotski stres i stres izazvan niskim temperaturama (Bohnert and Sheveleva, 1998; Chinnusamy *et al.*, 2008). Kod *A. thaliana* osmotski stres, kao i niske temperature indukuju ekspresiju miR168, miR171 i miR396, što dovodi do zaključka da su ove mikro RNK uključene u opšti odgovor biljaka na abiotički stres (Liu *et al.*,

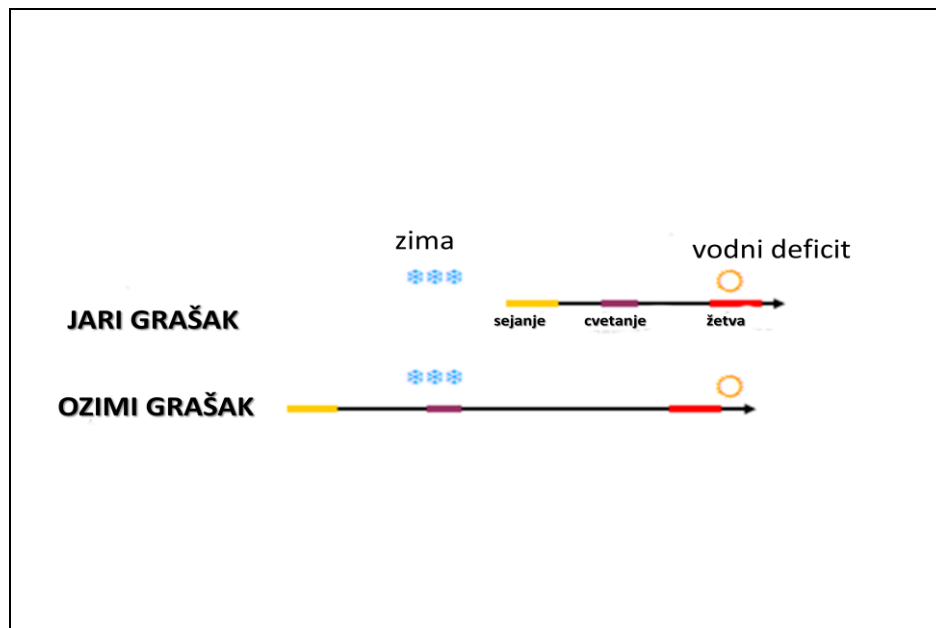
2008). Kompjuterskom analizom transkriptoma, kao i nalizom promotora, kod iste biljke su identifikovana četiri MIRNK gena koji se eksprimiraju pod uticajem niskih temperatura. Osim toga, *northern blot* analizom je potvrđeno da se zastupljenost transkripata miR165/miR166, miR169 i miR172 povećava ukoliko su biljke izložene hladnoći (Zhou *et al.*, 2008). Analizom promotorskog regiona MIRNK gena koji se indukuju niskim temperaturama otkriveno je prisustvo motiva koji su uključeni u odgovor na niske temperature, kao što su W-box (TTGAC), ABRE-core (ACGTGG/TC) i LTRE-core (A/GCCGAC) (Zhou *et al.*, 2008). Veliki broj konzerviranih mikro RNK, a koje učestvuju u odgovoru na niske temperature, kao svoje targete imaju transkripcione faktore koji regulišu procese razvića (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Ovaj podatak ukazuje da mikro RNK, u slučaju niskih temperatura, verovatno deluju tako što regulišu strukturne promene. Osim konzerviranih mikro RNK, veliki broj nekonzerviranih i species-specifičnih mikro RNK se indukuje tokom niskih temperatura. Tako, na primer kod pirinča, miR1435, miR1876, miR1320 i miR1884 se indukuju niskim temperaturama (Lv *et al.*, 2010), dok se kod topole ekspresija miR475a/b i miR476a smanjuje pod istim uslovima (Lu *et al.*, 2008).

Grašak

Grašak (*Pisum sativum* L.) predstavlja jednu od prvih vrsta koja je uzgajana u Evropi. Smatra se da grašak potiče sa Blisko-istočnog Mediterana, a prvi tragovi, nađeni u Turskoj i Iraku, datiraju sa početka neolita (7000 god. p.n.e.). U Evropu je donet preko Grčke, negde oko 5500 god. pre nove ere (Dore and Varoquaux, 2006).

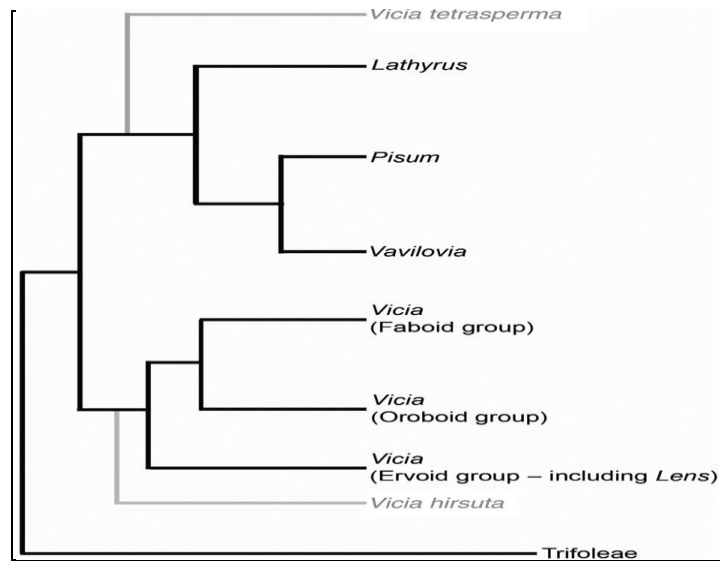
Danas se grašak koristi kako za ishranu ljudi, tako i za ishranu životinja. Sa ekonomskog stanovišta interesantan je podatak da pojedine sorte graška predstavljaju vrlo bitan izvor proteina (21-26% u zrnju), te se tako po količini proteina grašak nalazi između soje i cerealija. Najzastupljenija aminokisline u zrnju graška je lizin.

Kao i druge leguminoze, i grašak ima sposobnost fiksacije azota preko korenskih nodula. U zavisnosti od vremena sejanja, razlikuju se ozimi i jari grašak (Slika 10).



Slika 10. Ozimi i jari grašak i izloženost niskim temperaturama i suši

Iako je grašak bio jedan od prvih modela u klasičnoj genetici, i uprkos činjenici da postoje brojni mutanti u pogledu morfologije i cvetanja, malo se zna o molekularnoj biologiji ove vrste. Grašak je eudikotiledona biljka koja pripada familiji *Fabaceae*, poznata i kao leguminoze (ranije *Papilionaceae*). Vrsta je diploidna ($2n=14$), sa genomom veličine 4340Mb ($1C=4,4$ pg), i istovremeno kleistogamna i autogamna, s obzirom da neki insekti mogu dovesti do interspecijskog ukrštanja. Filogenetski posmatrano, pripada tribusu *Viceae* (slika 11). Na osnovu genetičkih i filogenetskih analiza, model leguminoza *Medicago truncatula* i grašak su veoma bliski u filogenetskom smislu, sa značajnim stepenom sintenije (kolinearnosti 2 genoma) (Aubert *et al.*, 2006). Takođe, primećena je i konzervacija redosleda markera: grupa 1 kod graška odgovara grupi 5 kod *M. truncatula*, veći deo grupe 3 kod graška odgovara grupi 3 kod *M. truncatula*. Iako se smatra da je distribucija markera koji se koriste u analizi vezanosti uglavnom kolinearna, ipak postoje izvesna odstupanja.



Slika 11. Filogenetsko stablo tribusa *Viciae* (Smykal et al., 2011)

CILJ RADA

Ovaj rad je urađen kao deo projekta „*Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog biodiverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju*“ (OI173005), a u okviru podprojekta koji se odnosi na transkripcione faktore i male RNK.

Istraživanja na nivou transkriptoma pokazuju da dehidratacija, kao jedan od faktora abiotičkog stresa koji se smatra glavnim uzročnikom smanjenja prinosa poljoprivredno značajnih kultura, dovodi do promene u ekspresiji gena, koji se mogu klasifikovati u dve grupe. Jednu grupu čine geni koji kodiraju protektivne proteine, dok drugu grupu čine geni koji kodiraju proteine sa regulatornom ulogom (transkripcioni faktori). Jedan od ključnih transkripcionih faktora čija se ekspresija menja tokom dehidratacije jeste DREB2A (DRE vezujući protein).

Osim transkripcionih faktora, najnoviji literturni podaci pokazuju da i male RNK (mikro RNK) imaju značajnu ulogu u odgovoru biljaka na abiotički stres.

S obzirom na navedeno, jedan od ciljeva ovog rada je bio izolovanje parcijalne cDNK za DREB2A iz graška (*Pisum sativum* L.) i praćenje njegove ekspresije tokom dehidratacije kao i tokom oporavka tretiranih biljaka. Osim toga, cilj je bio i fiziološka i biohemijska karakterizacija stanja biljaka izloženih stresu, koroz praćenje relativnog sadržaja vode, lipidne peroksidacije i akumulacije reaktivnih vrsta kiseonika. Jedan od postavljenih ciljeva bio je i praćenje ekspresije konzervisanih malih RNK – miR398a/b i miR408, kao i potencijalnih target gena (superoksid dismutaza, subjednica 5 citohrom C oksidaze i bakar-ATPaza) tokom dehidratacije i rehidratacije graška.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal i tretmani

Biljni materijal

Grašak (*Pisum sativum* L.) var. NS MRAZ, korišćen u eksperimentima, uzgajan je u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Semena biljaka su dobijena iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada.

Po devet semena je zasejano u saksije dimenzija 12cmX12cmX10cm, a kao supstrat je korišćena komercijalna zemlja za cveće. Saksije su redovno zalivane sa po 200 ml vode, tokom petnaest dana.

Tretmani

Petnaest dana stare biljke su podeljene u četiri grupe. U svrhu izazivanja dehidracije prekinuto je redovno zalivanje biljaka u periodu od 7 (grupa D₁), odnosno 10 dana (grupa D₂). Deo ove grupe biljaka je, nakon 10 dana tretmana, oporavljen odnosno rehidratisan zalivanjem u trajanju od 1 dana (grupa O). Kontrolna grupa biljaka (K) je redovno zalivana tokom perioda trajanja tretmana. Nakon navedenih faza tretmana prikupljeni su uzorci korena i nadzemnog dela biljaka, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C do korišćenja. Uzorci u kojima je određivana lipidna peroksidacija i količina ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta nisu zamrzavani, već su korišćeni sveži. Paralelno sa uzimanjem tretiranih uzoraka, uzimani su i uzorci kontrolnih biljaka (na početku tretmana, nakon 7 i 10 dana, i nakon oporavka biljaka), i napravljen je jedan zbrini kontrolni uzorak. Na ovaj način je eliminisana mogućnost uticaja dužine tretmana, odnosno starosti biljaka, na rezultate eksperimenta.

Određivanje relativnog sadržaja vode

Relativni sadržaj vode (RWC-Relative Water Content), kao jedan od najčešće korišćenih fizioloških parametara vodnog deficita, određivan je gravimetrijskom metodom (Barrs and Weatherley, 1962). Po jedan list sa svake biljke, iz kontrolne grupe, kao i od tretiranih biljaka je uzet, i nakon uzimanja uzoraka izmerena je masa svežih listova (FW). Odmah nakon merenja, listovi su hidratizirani stavljanjem u Petri posude sa destilovanom vodom, u trajanju od 4h, na sobnoj temperaturi. Nakon 4h, listovi su izvađeni iz Petri posuda, višak vode je pažljivo odstranjen upotrebom filter papira, i izmerena je masa hidratiziranih, odnosno turgidnih listova (TW). U cilju određivanja suve mase listova, uzorci su sušeni u pećnici na 80°C tokom 24h, do konstantne mase. Nakon sušenja, izmerena je masa suvih listova (DW). Relativni sadržaj vode u listovima je određivan po formuli

$$\text{RWC (\%)} = [(W-DW) / (TW-DW)] \times 100.$$

Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

Nivo lipidne peroksidacije u listovima je određivan TBARS metodom (Heath and Packer, 1986). Metoda se zasniva na određivanju količine malondialdehida (MDA) nastalog u reakciji peoksida lipida sa tiobarbituratnom kiselinom. Sveži listovi biljaka (0,5 g) su samleveni u avanu do finog praha, upotrebom tečnog azota. Dobijeni materijal je homogenizovan u istom volumenu 20% TCA (trihlorsirćetna kiselina), a dobijeni homogenati su zatim centrifugirani 20 minuta na 4000 rpm u Eppendorf mikrofugi. Dobijeni supernatant je dodat u isti volumen 20% TCA koja sadrži 0,5% TBA (tiobarbituratna kiselina). Dobijena smeša je zatim zagrevana u vodenom kupatilu na 95°C u trajanju od 30 minuta, a potom je brzo ohlađena na ledu. Nakon centrifugiranja na 10 000 rpm u trajanju od 15 minuta merena je apsorbancija supernatanta na 532 nm. Količina MDA se izračunava upotrebom molarnog ekstinkcionog koeficijenta za malondialdehid ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), i izražava se kao nmol MDA/DW.

Određivanje količine ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

Određivanje količine ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) vršeno je upotrebom fluorescentne boje 2',7'-dihlorodihidrofluorescin diacetata (DCFH-DA) (Allan and Fluhr 1997; Collen and Davison 1997). Korišćeni su sveži listovi kontrolnih i tretiranih biljaka, koji su odmah nakon uzimanja sa biljke isprani destilovanom vodom u trajanju od 5 minuta, na sobnoj temperaturi, a u cilju uklanjanja ROS nastalih kao posledica odsecanja listova sa biljke. Nakon ispiranja, višak vode je odstranjen upotrebom filter papira, i izmerena je masa listova. Pojedinačni listovi su stavljeni u epruvete sa 10 ml pufera (Tris 10 mM, KCl 50 mM pH 7,2 i 5 μ l of 100 mM DCFH-DA koji je rastvoren u dimetilsulfoksidu) i inkubirani 15 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije listovi su isprani istim puferom, homogenizovani u tečnom azotu sa 4 ml pufera i centrifugirani u mikrofugi na 13 000 rpm u trajanju od 10 minuta na 4 °C. Supernatant je prebačen u novu epruvetu, a merenje fluorescencije supernatanta vršeno je fluorimetrom (BioRad) upotrebom ekscitacionog filtera 488 nm i emisionog filtera 525 nm. Kao negativna kontrola reakcije (blank) korišćen je pufer u kojem je vršena homogenizacija. Količina ukupnih ROS-ova je izražena preko količine dihlorofluorescina (DCF) nastalog u reakciji, kao $\text{nmol min}^{-1}\text{g DW}$, upotrebom standardne krive.

Osnovne procedure rada sa RNK

Izolovanje ukupne RNK

Ukupna RNK, korišćena za reakciju reverzne transkripcije, RT-PCR i qRT-PCR, izolovana je upotrebom GeneJet RNA Purification kit-a (Fermentas, Litvanija). Korišćen je protokol za izolaciju RNK iz kvasaca, uz modifikacije. Najpre je biljno tkivo (koren i nadzemni deo) samleveno do finog praha u tečnom azotu. Biljno tkivo (do 100 mg) je prebačeno u mikrotube, dodato je 300 μ l pufera za lizu (u koji je prethodno dodat β -merkaptoetanol - 20 μ l 14,3M β -merkaptoetanola na savaki 1 ml pufera za lizu). Homogenizacija je vršena vorteksovanjem u trajanju do 1 minuta, a zatim je dodato 600 μ l razblažene proteinaze K - 10 μ l proteinaze K je razblaženo u 590 μ l TE pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA).

Smeša je zatim kratko vorteksovana i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, na orbitalnom šejkeru. Nakon toga, lizat je centrifugiran u mikrofugi 10 minuta na 13 000 rpm, a dobijeni supernatant je prebačen u novu mikrotubu. U supernatant je dodato 450 μ l 96% etanola, uz blago mućkanje smeše. Takva smeša je prebačena na GeneJet RNA Purification kolonu, a zatim centrifugirana 1 minut na 13 000 rpm. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu je odbačen, a kolona je zatim ispirana sa 700 μ l Wash pufera 1 (u koji je dodat etanol), a zatim je dodatno isprana sa 600 μ l Wash pufera 2, i na kraju sa 200 μ l Wash pufera 2. Nakon toga je kolona centrifugirana 2 minuta u mikrofugi na 13 000 rpm, u cilju uklanjanja ostataka Wash pufera. RNK, koja je ostala na koloni, eluirana je sa 100 μ l sterilne vode, uz centrifugiranje u mikrofugi na 13 000 rpm u toku 1 minuta. Dobijena RNK je čuvana na -80°C do dalje upotrebe.

Izolovanje ukupne RNK za Northern blot metodu

Ukupna RNK korišćena u *Northern blot* metodi izolovana je po metodi van Kan *et al.* (1992). Biljni material (koren i nadzemni deo) je samleveno do finog praha u tečnom azotu, upotrebom avana sa tučkom. Po 100 mg tkiva je prebačeno u mikrotube i dodato je 700 μ l ekstrakcionog pufera (8 M guanidin hidrohlorid, 20 mM 2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina (MES), 20 mM etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), 2% β -merkaptotanol, pH7). Homogenizacija je vršena na sobnoj temperaturi, uz povremeno vorteksovanje, ne duže od 30 sekundi, da ne bi došlo do zagrevanja homogenata. U takav homogenat je dodat isti volume (700 μ l) kiselog fenola, pH 5,2 (fenol saturisan natrijum citratom). Izvršeno je blago mućkanje a zatim i kratko vorteksovanje smeše, nakon čega je smeša centrifugirana u mikrofugi na 12 000 rpm, 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je prebačen u novu sterilnu mikrotubu, uz dodavanje iste zapremine smeše fenol (pH 5.2):hloroform:izoamilalkohol (25:24:1, vol). U cilju što boljeg mešanja faza, smeša je mućkana a zatim snažno vorteksovana i centrifugirana u mikrofugi 2 minuta na 12 000 rpm. Nakon toga, gornja (vodena faza) je prebačena u novu mikrotubu, a zatim je ponovljen korak sa dodatkom smeše fenol (pH 5.2):hloroform:izoamilalkohol (25:24:1, vol) kako bi se što bolje

prečistila RNK. Dobijena gornja faza je prebačena u novu sterilnu mikrotubu, a zatim je dodat isti volumen smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1, vol), dobijena smeša je mučkana i vorteksovana, a zatim centrifugirana 2 minuta na 12 000 rpm. Gornja faza (u kojoj je RNK) je prebačena u novu mikrotubu, a RNK je precipitirana upotrebom hladnog apsolutnog etanola (2 volumena u odnosu na zapreminu dobijene gornje faze) uz dodatak 1/20 volumena 3 M natrijum acetata pH 5,2. Smeša je blago promešana, a precipitacija je obavljena preko noći na -20°C. Nakon precipitacije i centrifugiranja u mikrofugi na 12 000 rpm u toku 10 minuta, dobijena RNK je isprana etanolom, osušena na vazduhu (na ledu) i rastvorena u 100 µl sterilne, dejonizovane vode.

Provera integriteta i kvantifikacija RNK

Kvantifikacija, odnosno određivanje količine dobijene RNK, kao i njena čistoća, određivana je spektrofotometrijski, upotrebom NanoVue aparata (GE Heltacre). Integritet dobijene RNK je proveren horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH8) pri naponu od 4-7 V/cm (Sambrok et al. 1989). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0,5 µg/ml) koja se interkalira u nukleinske kiseline i omogućava njihovu vizuelizaciju pod UV svetlom. Pre puštanja na gel, RNK je denaturisana u formamidnom puferu (10 ml dejonizovanog formamida, 200µl 0,5M EDTA pH 8, 10 mg boje ksilen cijanol i 10 mg boje bromofenol plavo) na 65°C u toku 10 min.

Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije, upotrebom M-MuLV reverzne transkriptaze. Najpre je smeša finalnog volumena 11 µl, koja sadrži 2 µg RNK i 2 µl 1 x "random-hexamer" prajmera, inkubirana 5 min na 70°C, a zatim je ohlađena na ledu. U smešu je

dodata smeša finalnog volumena 9 μ l, koja sadrži 4 μ l 5 x RT pufera (Fermentas) , 20 U "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas), 2 μ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas). Dobijena smeša je inkubirana 10 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C. Reakcija reverzne transkripcije zaustavljena je inkubacijom 10 min na 70°C, čime se inaktivira M-MuLV reverzna transkriptaza.

Northern blot

Elektroforeza RNK

Uzorci RNK su razdvajani vertikalnom elektroforezom, na 15% poliakrilamidnom denaturišućem gelu (dimenzije gela 8,5x10 cm). Pripremljen je stok akrilamidnog gela (50 ml) sledećeg sastava: 25 g uree, 5ml 10x MOPS (200 mM, pH7), 18,75ml 40% smeše akrilamid:bisakrilamid (19:1), i sterilna voda do finalnog volumena. Rastvor je neophodno zagrejati u vodenom kupatilu na 45°C kako bi se urea rastvorila, a nakon toga se stok čuva u frižideru na 4°C. Za pravljenje jednog gela potrebno je 12 ml stoka, a polimerizacija se inicira dodavanjem 4 μ l TEMED (tetrametilendiamin) i 50 μ l 10 % APS (amonijumpersulfat). Polimerizacija gela traje najmanje 1h, na sobnoj temperaturi, a gel je neophodno prekriti vlažnom papirnom vatom da bi se sprečilo isušivanje gela. Pre nanošenja uzoraka na gel, neophodno je isprati ležišta u gelu sa 1xMOPS, i ekvilibrirati gel elektroforezom bez uzoraka u trajanju od 1h, u 1xMOPS, na 110 V. Uzorci RNK, kao i uzorci markera za male RNK (small RNA molecular weight marker - New England Biolabs) su pripremljeni za elektroforezu denaturacijom u 10 μ l formamidnog pufera (10 ml dejonizovanog formamida, 200 μ l 0,5M EDTA pH 8, 10 mg ksilen cijanola, 10 mg boje bromofenol plavo) na 65°C u toku 10min. Za elektroforezu je korišćeno 15 μ g ukupne RNK (izolovane metodom po van Kan *et al.*, 1992), odnosno 0,25 μ l markera, u finalnom volumenu od 20 μ l. Nakon denaturacije, uzorci su naneti na gel, a elektroforeza je izvršena u 1xMOPS, na 110 V, u trajanju od 3h, ili dok front ksilen cijanol boje ne izađe iz gela.

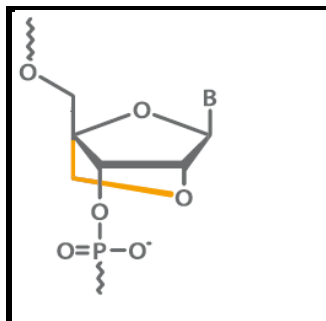
Prenos RNK na membranu

Za prenos RNK sa gela korišćena je Hybond-NX membrane (GE Heltcare). Prenos na membranu je izvršen elektrotransferom, upotrebom Biometra Semy-dry sistema za transfer. Korišćen je 3MM Whatman papir, veličine gela, natopljen u sterilnu, dejonizovanu vodu. Raspored u sistemu za transfer bio je sledeći: 3MM Whatman papir/membrane/gel/3MM Whatman papir. Nakon slaganja, višak vode je odstranjen, a transfer je izvršen na 20 V, u trajanju od 60 min, na 4°C. Nakon prenosa RNK na membranu, urađeno je hemijsko vezivanje RNK za membranu-“crosslinking”. Ova metoda, za razliku od vezivanja pod dejstvom UV svetla, omogućava bolje vezivanja proba i vizuelizaciju (Pall et al., 2007). Rastvor za vezivanje (122,5 µl 1-metilimidazola, pH8, 0,373 g EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid); sterilna voda, finalni volume 12 ml) je pripremljen svež, neposredno pre reakcije vezivanja. Whatman papir (3MM) veličine membrane je potopljen u rastvor za vezivanje, a na njega je stavljena membrana, orijentisana tako da strana sa RNK nije u kontaktu sa papirom. Sve je uvijeno u saran foliju, i ostavljeno 1h na 60°C.

Radioaktivno obeležavanje proba

U Northern blot metodi kao probe za odgovarajuće miRNK (miR398a/b i miR408) korišćene su komercijalno dostupne LNA (Locked Nucleic Acid) probe (Exiqon). Ovakve probe predstavljaju modifikovane nukleotide, u kojima postojanje metilenskog mosta između 2'O i 4'C atoma “zaključava” nukleotid u *endo* konformaciji (Slika 12), čime se povećava specifičnost probe. Kao proba za U6 RNK korišćen je jedan od prajmera za amplifikaciju U6 RNK *A. thaliana*. Probe su obeležavane u reakciji kinaziranja (5' obeležavanje), upotrebom T4 kinaze (Fermentas). Reakcija obeležavanja 5' kraja dvolančane probe vršena je pomoću T4 polinukleotidne kinaze (Fermentas). Reakciona smeša finalne zapremine 20 µl je sadržala sledeće komponente: 10 pmol odgovarajuće probe, 5 µl 3000 Ci/mmol [γ -³²P] ATP, 1 x pufer A (Fermentas) i 10 U T4 polinukleotidne kinaze (Fermentas). Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37⁰C, nakon čega

su neugrađeni radionuklidi odstranjeni propuštanjem kroz G-25 kolonu (GE Healthcare). Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određen je merenjem na scintilacionom brojaču.



Slika 12. LNA nukleotid (www.exiqon.com)

Hibridizacija

Nakon hemijskog vezivanja, izvršena je pre-hibridizacija membrana u ULTRA Oligo Hybridization buffer (Ambion), u trajanju od 2h na 42°C. Nakon toga su u hibridizacioni pufer dodate obeležene odgovarajuće probe, a hibridizacija je obavljena preko noći, na 42°C (osim u slučaju endogene probe U6, gde se hibridizacija odvijala na 37°C). Nakon toga, membrane su isprane tri puta u 2x SSC (20x SSC stok: 3 M natrijum hlorid, 0,3 mM natrijum citrat, pH7) uz dodatak 0,1% SDS (natrijum dodecilsulfat) na 42°C, u trajanju od po 5-15 minuta, u zavisnosti od fona membrane, koji je povremeno proveravan upotrebom Gajger-Milerovog brojača. Smatra se da je pranje završeno kada se fon spusti ispod 20 cps. Nakon toga je membrane stavljana u plastičnu foliju, i eksponirana prislanjanjem X-ray BioMax MS filma (Kodak) u kaseti za ekspoziciju (BioMax, Kodak) sa ekranom za pojačavanje (BioMax, Kodak). Kaseti sa membranom i filmom je ostavljana na -80°C tokom 2-5 dana, u zavisnosti od jačine signala. Za hibridizaciju membrane sa U6 RNK, kao endogenom kontrolom, urađeno je uklanjanje postojećih proba (“stripping”), potapanjem membrane u ključali rastvor 0,1% SDS.

Osnovne procedure rada sa DNK

Izolovanje genomske DNK

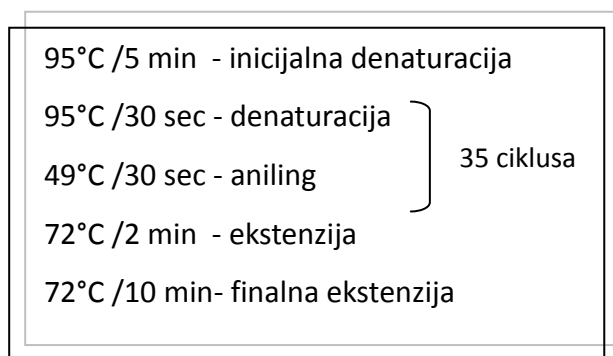
Genomska DNK model leguminoze *Medicago truncatula* izolovana je upotrebom DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen). Korišćeno je 100 mg tkiva klijanaca *M. truncatula*, koji su samlevani u avanu, sa tečnim azotom, do finog praha. Materijal je prebačen u sterilne mikrotube, a zatim je dodato 400 µl AP1 pufera i 4 µl RNaze A (100 mg/ml), sve je dobro promešano vorteksovanjem u trajanju od 30 sekundi i inkubirano na 65°C 10 minuta, uz povremeno mešanje. Zatim je u lizat dodato 130 µl AP2 pufera, izmešano pipetom i inkubirano na ledu 5 minuta. Zatim je lizat prebačen u QIAshredder Mini spin kolonu i centrifugiran u mikrofugi 2 minuta na 14 000 rpm. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu je prebačen u novu sterilnu mikrotubu i dodato je 1,5 volumena pufera Ap3/E. Smeša je promešana a zatim prebačena na DNeasy Mini spin kolonu, centrifugirana 1 minut u mikrofugi na 14 000 rpm, a sadržaj koji je prošao kroz kolonu je odbačen. Kolona je zatim isprana dva puta sa po 500 µl AW pufera, uz centrifugiranje 2 minuta na 14 000 rpm. Na kraju, DNK sa kolone je eluirana sa 100 µl AE pufera, uz inkubiranje na sobnoj temperature tokom 5 minuta i centrifugiranje na 14 000 rpm 1 minut. Koncentracija DNK je izmerena na NanoVue aparatu (GE Heltcare), a dobijna DNK je čuvana u frižideru na 4°C.

Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)

Umnožavanje fragmenata DNK

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 0,5 ml mikrotubama tako što su pomešani matrica DNK, 0,2 mM dNTP smeša, 10 pmol prajmera, 2,5 mM MgCl₂ i 10x Taq pufer sa KCl. Reakcije PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) su rađene u volumenu od 25 µl reakcione smeše sa 50 ng genomske DNK kao matrice i sa 1U enzima Taq polimeraze (Fermentas). Profil reakcije se sastojao od inicijalne denaturacije, za kojom je sledio odgovarajući broj ciklusa

denaturacije, vezivanja prajmera i ekstenzije, kao i finalne produžene ekstenzije. Nazivi i sekvence prajmera koji su korišćeni dati su u Tabeli 1. Temperaturni profil reakcije je prikazan na slici 13.



Slika 13. Temperaturni profil PCR reakcije korišćene u ovom radu

Tabela 1. Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
D1 F	5'-TAAACCAAAGCGTAAAGCACCGGC-3'
D1 R	3'-TCATCAGGCTCATCCATTGGCTCT-5'
CSD1F	5'-AGTCAGGAGGGAAATGGTCC-3'
CSD1R	3'-AAACTACTGGAAATGCTGGT-5'
Cox5bF	5'-AGCTGCTTCGGTCAAAAAGA-3'
Cox5bR	3'-ACAGCAGGTGCGTCCTTAGT-5'
P1B ATP F	5'-GAGACAGGGAAGAAGCAGTTG-3'
P1B ATP R	3'-CCATCGCAACATGATGTCCAG-5'

RT-PCR reakcija amplifikacije PsDREB2A

RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) je varijanta PCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK. U ovom slučaju je za amplifikaciju *PsDREB2A* korišćena metoda RT-PCR. Reakcija je rađena u mikrotubama zapremine 0,5 ml, tako što je pomešana matrica (cDNK), po 10 pmola prajmera, 10x High Fidelity pufer sa 15 mM MgCl₂. Reakcija je rađena u finalnom volumenu od 25 µl, sa 50 ng cDNK kao matrice i sa 5U High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas).

Analiza produkata PCR i RT-PCR na agaroznom gelu

Elektroforetska analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu (Sambrook *et al.* 1989) odgovarajuće koncentracije (2%). Kao pufer za pripremanje gelova korišćen je 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH=8). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom.

Elektroforeza je tekla u 1xTAE puferu, pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom, a trajni zapis rezultata je dobijen fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike (BioDocAnalyze System). Veličina fragmenata DNK je određena pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

Prečišćavanje PCR produkata

Za prečišćavanje produkata dobijenih PCR reakcijama korišćen je QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Najpre se pomeša PCR reakciona smeša i pufer PB u odnosu 1:5, a zatim doda 10 µl 3M Na-acetata pH 5. Smeša se dobro promeša i nanese na QIAquick kolonu i centrifugira u mikrotubi 1 min na 13000 rpm (adsorpcija DNK). Zatim se filtrat odbaci i nanese 750 µl pufera PE na kolonu, centrifugira na 13000 rpm/1 min (ispiranje DNK od nečistoća). Filtrat se odbaci i ponovi centrifugiranje u mikrofugi 1 min na 13000 rpm. Kolona se prebaci u novu mikrotubu, nanese 30 µl pufera EB i inkubira 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm/dobija se eluat u kome je rastvoren prečišćeni PCR produkt. Koncentracija i čistoća DNK određeni su merenjem na spektrofotometru.

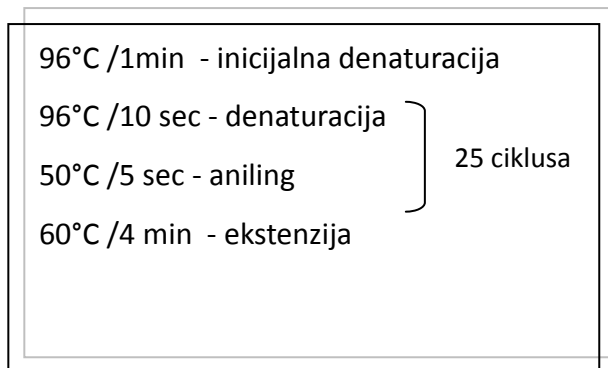
Sekvenciranje PCR produkata

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminator v 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se, pored deoksinukleotida, koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger *et al.* 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su svi dideoksinukleotidi obeleženi istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj, umesto u četiri odvojene PCR reakcije.

Prvo je PCR reakcijom umnožen region DNK koji treba da se sekvencira. Nakon provere PCR produkta elektroforezom, vršeno je njegovo prečišćavanje na koloni. Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR produkata merena je na spektrofotometru.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 µl je sadržala sledeće komponente:

- 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp)
- 3,2 pmol prajmera
- 3 µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)



Slika 14. Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje

Produkti PCR reakcije za sekvenciranje su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se dodaje 40 μ l 3M Na-acetata, promućka i centrifugira u mikrofugi 20 min na 13000 rpm. Zatim se supernatant ukloni, a u preostali talog se doda 200 μ l 70% etanola. Sve se centrifugira na 13000 rpm /10 min. Nakon toga se supernatant ukoni i ponovi korak ispiranja sa etanolom. Dobijeni talog se u potpunosti osuši, rastvori u 25 μ l Hi-Di formamida i celokupna količina se nanese u bunarić na mikrotitarskoj ploči.

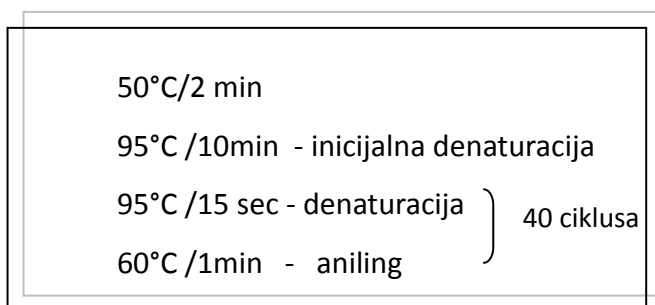
Dobijeni rezultati su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

Analiza ekspresije gena pomoću "Real-Time" PCR (qPCR) metode

Za analizu ekspresije gena korišćena je metoda kvantitativnog PCR u realnom vremenu (qPCR). Korišćene su 2 osnovne qPCR tehnike: 1) SYBR Green (za analizu ekspresije potencijalnih target gena - *CoxVb*, *SOD* i *Cu-ATP-aza*), i 2) TaqMan esej (u slučaju analize ekspresije *PsDREB2A*). U ovom radu kvantifikacija ekspresije gena od interesa je vršena metodom

relativne kvantifikacije, i to komparativnom ddCt metodom (Livak *et al.*, 2001) gde je rezultat izražen kao relativni odnos količine referentnog uzorka (kalibrator) i merenog uzorka. Kao endogena kontrola (referentni gen) u qPCR reakcijama korišćen je β -tubulin, s obzirom da je to gen čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom eksperimentalnih tretmana (Die *et al.*, 2010).

Za analizu ekspresije *PsDREB2A* korišćena je TaqMan-MGB metoda. Prajmeri i probe za ovu reakciju su dizajnirani od strane proizvođača eseja Assay-by-Design (Applied Biosystem, USA). Smeša PCR reakcije, u volumenu od 20 μ L sadržala je 1 μ L cDNK (50 ng), 10 μ L 2x TaqMan PCR MasterMix (Applied Biosystem, USA) i 1 μ L of 20x TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem, USA).



Slika 15. Temperaturni profil qPCR reakcije

U slučaju qPCR reakcije gde je korišćena SYBR Green metoda, PCR smeša (volume 20 μ l) sadržala je 1 μ L cDNK (50 ng), 10 μ L 2x SYBR GREEN Mix (Fermentas) i po 10 pmol prajmera. S obzirom na to da SYBR Green tehnika za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera, za procenu specifičnosti reakcije primenjuje se analiza krive topljenja ("melting curve analysis"). U ovoj analizi, tokom qPCR reakcije temperatura postepeno raste od 65°C do 95°C, pri čemu se

konstantno prati nivo fluorescencije. U prisustvu dvolančane DNK, intenzitet fluorescentnog signala će biti visok pri niskim temperaturama, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja, pa će davati različite maksimume fluorescencije (pik). U prisustvu samo jednog, specifičnog PCR produkta detektovaće se samo jedan pik. Takođe, da bi rezultat primenom ove metode bio tačan, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno jednaka i $> 96\%$.

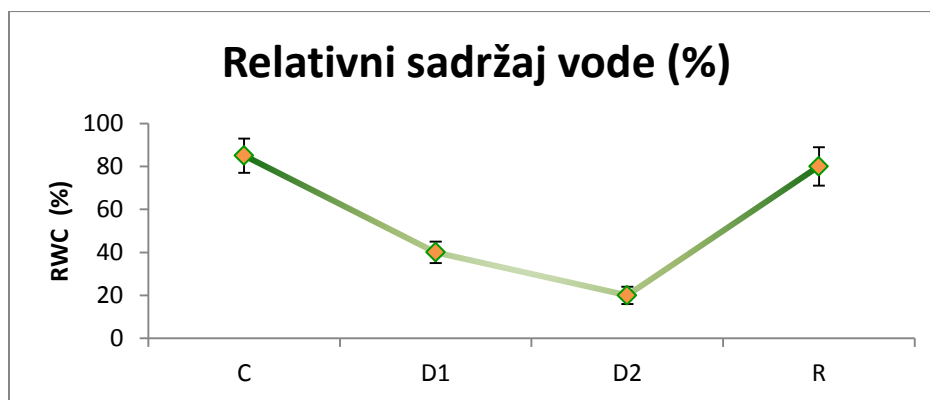
Statistička analiza

Svi ispitivani paramteri su određeni u tri nezavisna ponavljanja eksperimenta, pri čemu su sakupljeni podaci dobijeni sa 10 biljaka iz svake grupe (kontrola i tretmani). Za statističku obradu podataka korišćen je Sigma Stat program i „One way ANOVA“ test.

REZULTATI

Morfološke promene i relativni sadržaj vode (RWC)

U cilju ispitivanja odgovora graška (*P. sativum* var. NS MRAZ) dve nedelje stare biljke su podvrgnute tretmanu dehidracijom. Tretman je obavljan tako što je ukinuto zalivanje biljaka u trajanju od 7, odnosno 10 dana. Nakon toga su biljke rehidratirane zalivanjem, a uzorci su uzeti nakon 24h. Tokom tretmana dehidracijom kod graška je moguće uočiti dve faze. Prva faza predstavlja inicijalni period brzog pada relativnog sadržaja vode (C-D₁). U ovoj fazi, nakon 7 dana od početka tretmana dehidracijom, dolazi do brzog gubitka vode u tkivima, tako da je kod tretiranih biljaka zabeležen pad RWC-a sa 85% na 40% (**Slika 16**). Drugu fazu dehidracije karakteriše nešto sporiji pad RWC, tako da je nakon 10 dana tretmana zabeležen RWC od 20% (**Slika 16**). Sa padom RWC-a dolazi i do morfoloških promena na listovima tretiranih biljaka. Usled gubitka turgora listovi se savijaju na dole, a adaksijalna površina se okreće ka unutrašnjosti (**Slika 17**). Nakon dehidracije u trajanju od 10 dana biljke koje su podvrgnute rehidraciji zalivanjem rehidrišu svoja tkiva, uspostavljajući odgovarajući turgor u ćelijama, tako da je RWC kod rehidratiranih biljaka sličan onome koji je zabeležen kod kontrolne grupe (C).



Slika 16. Relativni sadržaj vode u listovima graška. **C**-kontrola, **D₁**-dehidracija 7 dana, **D₂**-dehidracija 10 dana, **R**-oporavak. Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na grafiku su prikazane standardne greške.

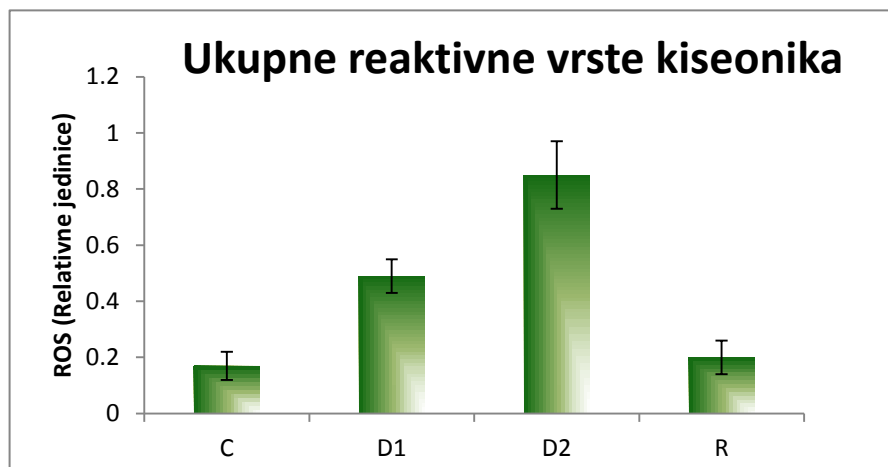


Slika 17. Izgled kontrolnih i tretiranih biljaka. **C**-kontrola, **D₁**-dehidracija 7 dana, **D₂**-dehidracija 10 dana, **R**-oporavak.

Akumulacija ukupnih reaktivnih vrsta kiseonika

Ukupne reaktivne vrste kiseonika (ROS) određivane su u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka primenom fluorescentne boje dihidrofluorescina. Dehidracija biljaka dovodi do povećane akumulacije ukupnih reaktivnih vrsta kiseonika (**Slika 18**). U provoj fazi dehidracije, nakon 7 dana tretmana, primetno je povećanje nivoa ROS u listovima biljaka, u poređenju sa listovima kontrolne grupe, i to skoro 3 puta, izraženo u relativnim jedinicama. Najveći porast ukupnih ROS zabeležen je kod biljaka tretiranih 10 dana, kod kojih je nivo reaktivnih vrsta kiseonika skoro pet puta veći u poređenju sa nivoom zabeleženim kod biljaka kontrolne grupe koje su redovno zalivane. Kod grupe biljaka koje su nakon 10 dana tretmana rehidratirane

zalivanjem u periodu od 24h, nije zabeleženo povećanje količine ROS, u poređenju sa kontrolnim biljkama (**Slika 18**).

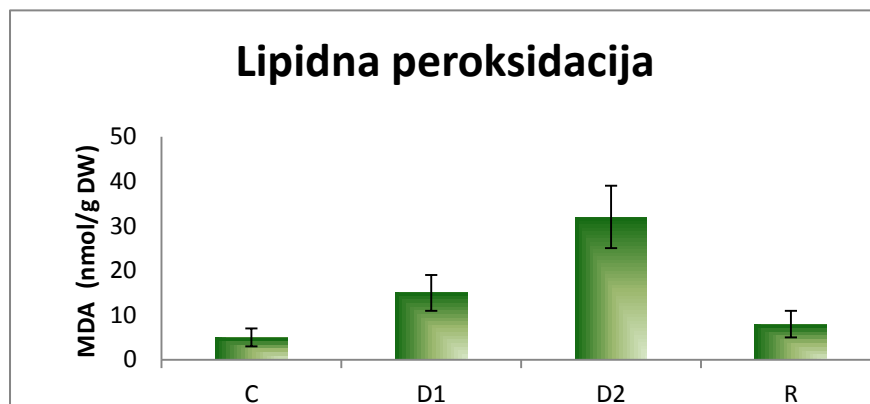


Slika 18. Akumulacija ukupnih reaktivnih vrsta kiseonika u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka. **C**-kontrola, **D₁**-dehidratacija 7 dana, **D₂**-dehidratacija 10 dana, **R**-oporavak. Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

Lipidna peroksidacija

Nivo lipidne peroksidacije u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka određivan je u reakciji sa TBA, a izražen je kao nivo nastalog malondialdehida (MDA) po gramu suve mase tkiva. Nivo lipidne peroksidacije ima sličan profil kao i akumulacija ROS - prva faza dehidratacije u trajanju od 7 dana dovodi do povećanja količine nastalog MDA za tri puta u odnosu na kontrolnu grupu biljaka – izmereno je 15 nmol MDA/g DW, dok je u kontroli ta vrednost iznosila 5 nmol MDA/g DW (**Slika 19**). Nakon 10 dana tretmana dolazi do daljeg povećanja količine MDA, koji je kod dehidratiranih biljaka u fazi D₂ najviši, duplo veći nego kod biljaka iz faze D₁, i iznosi 32 nmol MDA/g DW. Osim toga, ova maksimalna vrednost količine MDA je 6 puta veća u poređenju sa količinom MDA koja je izmerena kod kontrolne

grupe biljaka. Nakon rehidracije, i dalje se akumulira MDA u listovima biljaka (8 nmol MDA/g DW), ali taj nivo nije statistički značajno različit u odnosu na nivo kod kontrole.



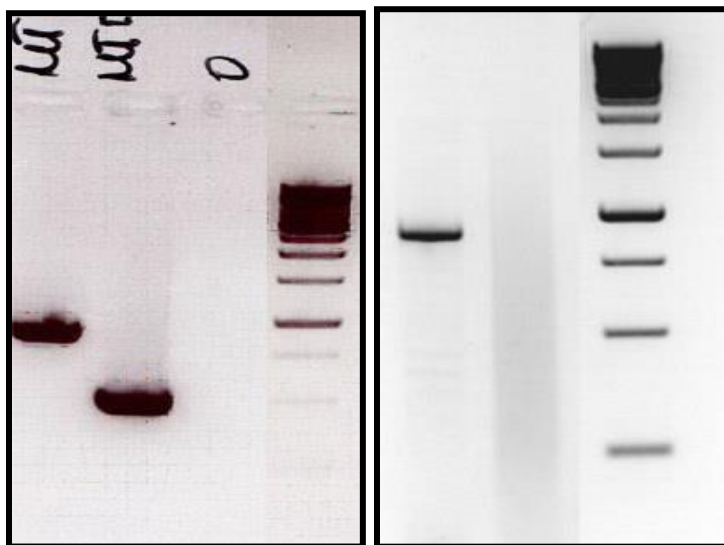
Slika 19. Lipidna peroksidacija u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka. **C**-kontrola, **D₁**-dehidracija 7 dana, **D₂**-dehidracija 10 dana, **R**-oporavak. Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

Izolovanje dela gena za DREB2A transkripcioni faktor graška

Imajući u vidu da o genima za transkripcione faktore iz DREB familije postoje podaci uglavnom na žitaricama i na nekim vrstama značajnim za hortikulturu, karakterizacija svakog novog gena, posebno kod vrsta značajnih u poljoprivredi, predstavlja značajan doprinos u njihovoj analizi. U cilju izolacije dela gena za DREB2A graška opredelili smo se za cDNK koja je sintetisana iz ukupne informacione RNK izolovane iz dehidratiranih listova graška, s obzirom da je očekivano da se u tim uslovima ekspirira ovaj gen. Ova pretpostavka proizašla je iz saznanja da dinamičnost procesa tokom dehidracije podrazumeva uključivanje i gašenje različitih grupa gena, kao što su geni za transkripcione faktore, različite enzime i protektivne proteine, kao i mnogi drugi. Prema literaturnim podacima, do danas nema izolovanih gena iz DREB familije kod graška, te ovo predstavlja značajan doprinos, posebno imajući u vidu da se radi o novoj sorti graška-varijetet NS MRAZ.

PCR amplifikacija PsDREB2A i analiza sekvence

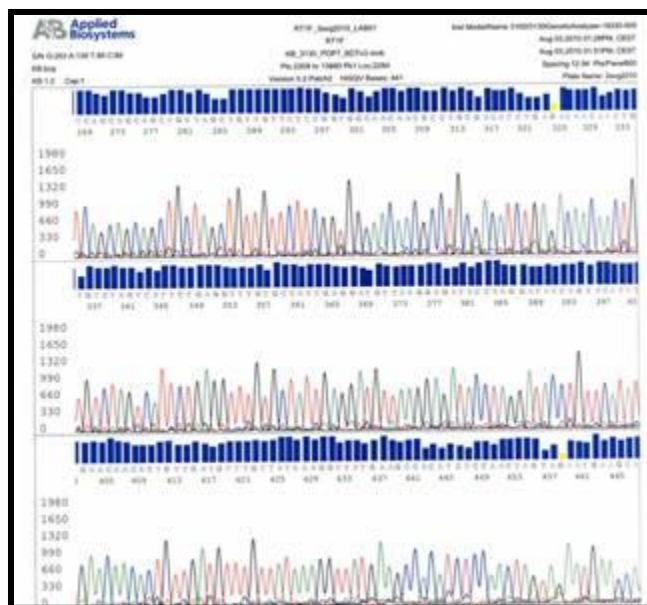
U cilju izolovanja cDNK koja kodira DREB2A protein graška, izvođena je reakcija lančanog umnožavanja u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence *DREB2A* iz model biljke *Medicago truncatula* (DQ908959.1). Kao matrica u ovoj reakciji korišćena je cDNK, nastala prepisivanjem ukupne informacione RNK iz dehidratiranih listova graška. U cilju provjere specifičnosti prajmera, najpre je izvršena reakcija lančanog umnožavanja u kojoj su isti prajmeri korišćeni, a kao matrica korišćena je genomski DNK izolovana iz model leguminoze *M. truncatula* (**Slika 20A**). U RT-PCR reakciji sa cDNK iz dehidratiranih listova graška, dobijen je PCR product veličine 493 bp (**Slika 20**).



Slika 20. PCR amplifikacija *PsDREB2A*. (A) Provera prajmera na genomskoj DNK *M.truncatula*, (B) PCR amplifikacija *PsDREB2A* na cDNK graška.

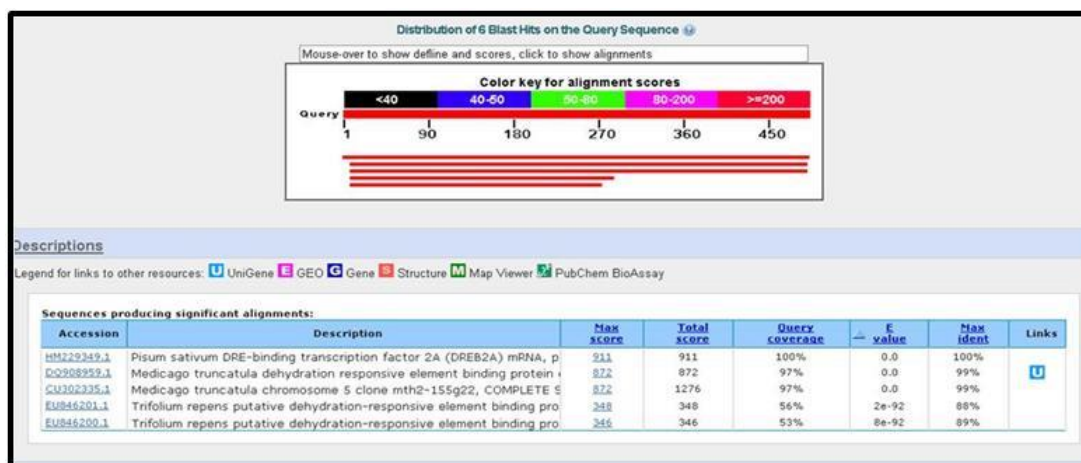
Nakon PCR amplifikacije i provjere na 2% agaroznom gelu, dobijeni proizvod PCR reakcije je prečišćen i sekvenciran (**Slika 21**). Sekvenciranje je obavljeno sa D₁F i D₁R prajmerom, a sekvenciran je produkt od 493 bp.

Kompjuterskom analizom u kojoj je korišćen BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritam ustanovljeno je da je sekvenca dobijeng PCR proizvoda, uz korišćenje nukleotidne baze (nucleotide collection nr/nt) kao i izborom algoritma za najbližnje sekvence (megablast), 99% identična sa sekvencom *EREBP* (ethylne responsive element binding protein) iz *M.truncatula*, kao i sa *DREB2A* iste vrste (**Slika 22**). Dobijena sekvenca predstavlja parcijalnu sekvencu cDNK i deponovana je u Gene Bank (HM229349).

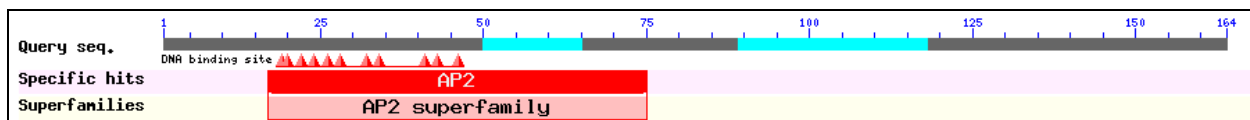


Slika 21. Hromatogram nakon kapilarne elektroforeze PCR produkta

Primenom Expsy Translation tool programa, na osnovu nukleotidne sekvence dobijena je sekvenca dela proteina od 164 aminokiseline. Upotrebom programa BLASTP za proteinske sekvence, i izborom odgovarajuće baze podataka (non-redundant protein sequences- nr) urađeno je poređenje sa dostupnim proteinskim sekvencama. Rezultati su pokazali da izvedena aminokiselinska sekvenca pokazuje najveću sličnost sa *DREB2A* proteinom iz *M.truncatula* (ABJ88942.1) kao i sa *ERBP* (XP_003616701.1) iste vrste. Takođe, u okviru aminokiselinske sekvence, između 17. i 55. aminokiseline uočen je konzervisan AP2 domen (**Slika 23**).

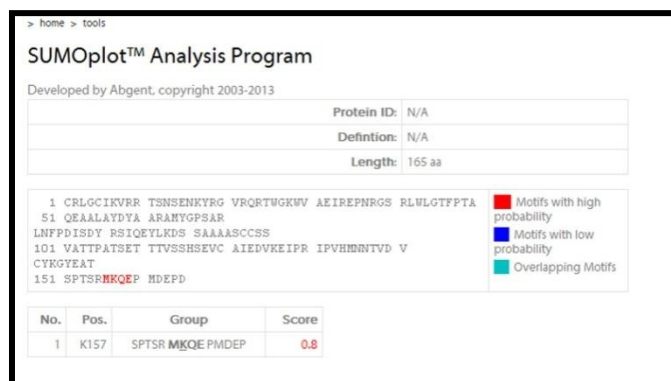


Slika 22. Poređenje sekvenci primenom BLAST programa



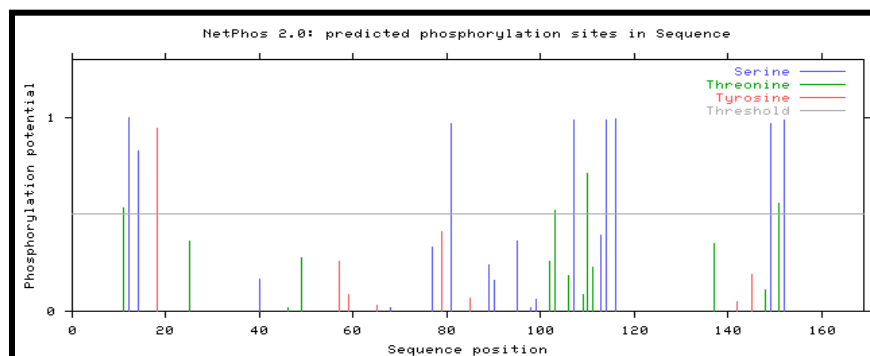
Slika 23. Konzervisan AP2 domen u okviru aminokiselinske sekvence PsDREB2A.

Imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da su za aktivaciju i/ili inaktivaciju proteina iz DREB familije neophodne post-translacione modifikacije, odlučili smo se za ispitivanje najčešće pominjanih modifikacija ove grupe proteina. Analiza potencijalnih post-translacionih modifikacija (sumoilacija i fosforilacija) proteina pokazala je da postoje potencijalna mesta za ovakve modifikacije. Upotrebom SUMOplot programa utvrđeno je da, u okviru ispitivanog dela proteina, postoji jedno potencijalno mesto za sumoilaciju, i to na poziciji Lys157 (MKQE) (Slika 24).

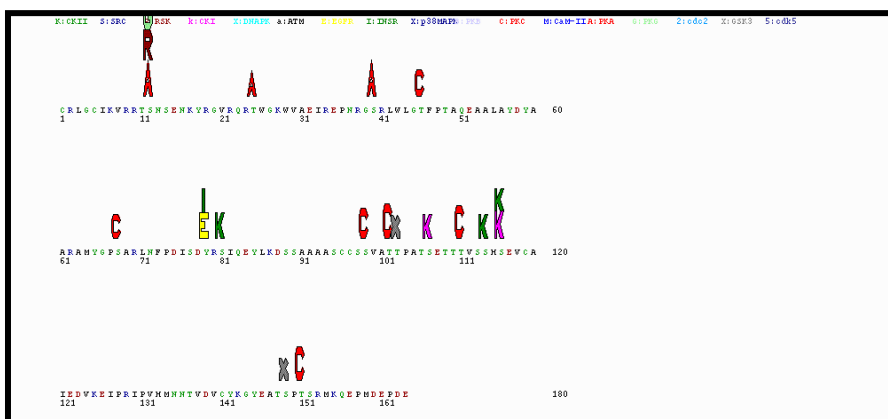


Slika 24. Predikcija sumoilacije proteina u SUMOplot programu

Predikcija fosforilacije proteina urađena je u programu NetPhos 2.0 i NetPhos K, a dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo potencijalnih mesta fosforilacije (Slika 25). Rezultati pokazuju da su najzastupljenija mesta za fosforilaciju ostaci Ser, i to na 8 mesta. Posle Ser, najveća verovatnoća za fosforilaciju je Tyr, i to na samo jednoj poziciji. Upotrebom NetPhos K utvrđena su mesta potencijalnih fosforilacija specifičnih kinaza. Na osnovu dobijenog “landscape” može se zaključiti da je protein kinaza A najverovatnije ta koja vrši fosforilaciju već pomenutih aminokiselinskih ostataka.

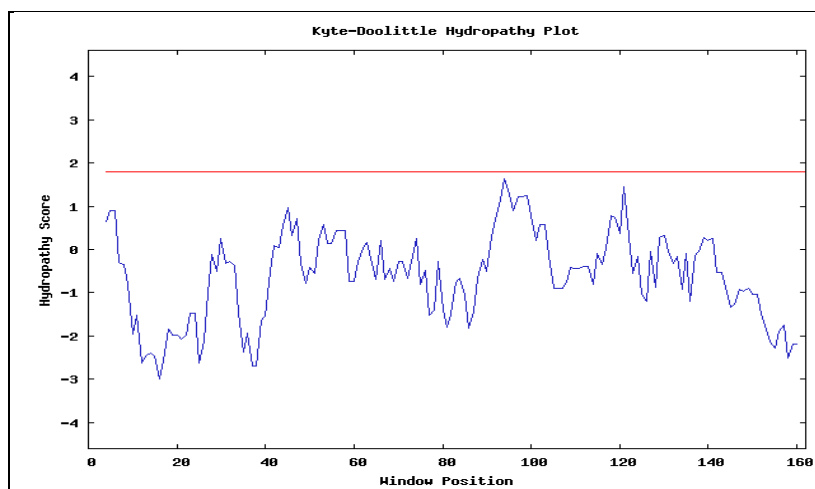


Slika 25A. Potencijalna mesta fosforilacije u okviru PsDREB2A



Slika 25B. Predikcija potencijalnih mesta delovanja odgovarajućih kinaza u NetPhos K programu

Analiza hidrofobnosti dela proteina na osnovu aminokiselinske sekvence (Kyte-Doolittle scale) pokazala je da je potencijalni protein hidrofilan (Slika 26).



Slika 26. Hidrofobnost proteina po Kyte-Doolittle metodi

Profil ekspresije *PsDREB2A* gena

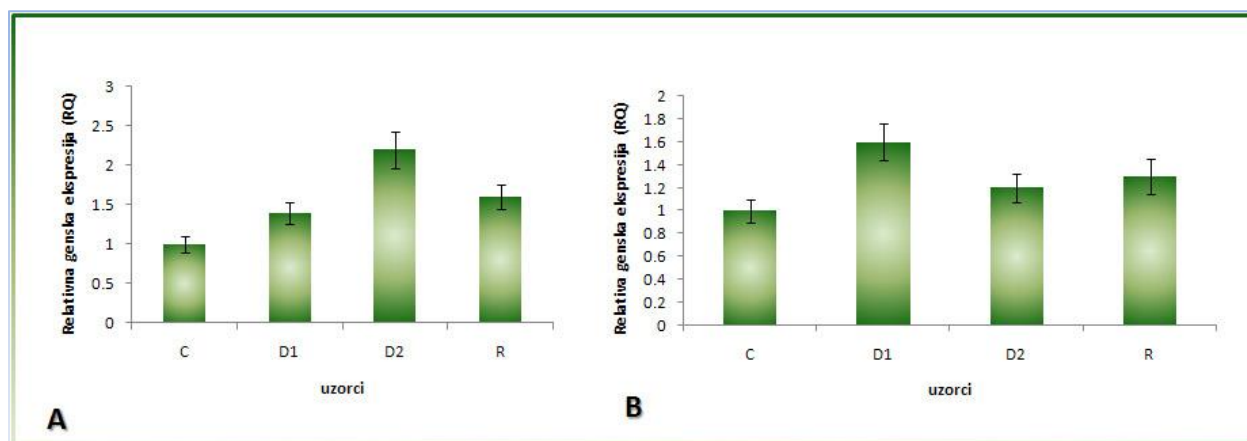
Analiza ekspresije PsDREB2A gena u uslovima dehidracije metodom Real-time PCR

U cilju ispitivanja ekspresije *PsDREB2A* gena u uslovima dehidracije, kompletno razvijene biljke starosti 15 dana su bile podvrgnute dehidraciji ukidanjem zalivanja u trajanju od 7 i 10 dana. Nakon 10 dana tretmana biljke su rehidratirane zalivanjem a uzorci su uzeti nakon 24h. Radi relativne kvantifikacije zastupljenosti specifične iRNK primenjen je Real-time PCR metod, gde je kao unutrašnja (endogena) kontrola, tj. kao referentni gen korišćen gen za β tubulin. S obzirom da je u Real-time PCR reakciji korišćen “*TaqMan assay-assay by design*” nije bilo potrebno uraditi standardizaciju metode (određivanje efikasnosti amplifikacije) jer proizvođač eseja garantuje da je efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole ista.

Analiza ekspresije *PsDREB2A* gena graška pokazala je da postoje kako kvalitativne, tako i kvantitativne razlike u nivou ekspresije ovog gena u korenu i u nadzemnom delu biljke (**Slika 27**). Kod korena (**Slika 27A**), prva značajna promena u nivou zastupljenosti specifične iRNK primećena je posle 7 dana tretmana, tj. u prvoj fazi dehidracije označenoj kao D₁, gde je RWC 40%. Sa daljom dehidracijom, kod biljaka koje su bile 10 dana pod tretmanom (faza D₂, 20% RWC) zabeleženo je najizrazitije povećanje nivoa ekspresije gena - 2,2 puta veći nivo ekspresije nego kod kontrolnih biljaka koje su redovno zalivane. Nakon rehidracije, nivo ekspresije *PsDREB2A* gena je niži nego kod dehidratiranih biljaka, ali je istovremeno viši u odnosu na kontrolnu grupu, sa vrednošću koja je približno slična onoj zabeleženoj kod biljaka nakon 7 dana tretmana.

U slučaju nadzemnog dela biljke, profil ekspresije *PsDREB2A* gena je različit u odnosu na profil ekspresije zabeležen kod korenova. Nakon 7 dana dehidracije zabeležen je najveći porast ekspresije *PsDREB2A* gena (**Slika 27B**). Iako je najveći u slučaju nadzemnog dela biljke, ovaj porast relativne zastupljenosti specifične iRNK je ipak manji nego maksimum ekspresije koji je dostignut kod korenova. Sa daljom dehidracijom ne dolazi do povećanja nivoa ekspresije *PsDREB2A*, već njegova ekspresija opada, tako da je kod biljaka koje su bile pod

tretmanom 10 dana, kao i kod rehidratiranih biljaka taj nivo manji nego onaj zabeležen u fazi D₁, a istovremeno nije statistički gledano različit od nivoa ekspresije *PsDREB2A* u nadzemnom delu kontrolne grupe biljaka.



Slika 27. Real-time PCR analiza ekspresije *PsDREB2A* gena kod graška nakon tretmana dehidratacijom: korenovi (A) i nadzemni deo biljke (B). Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

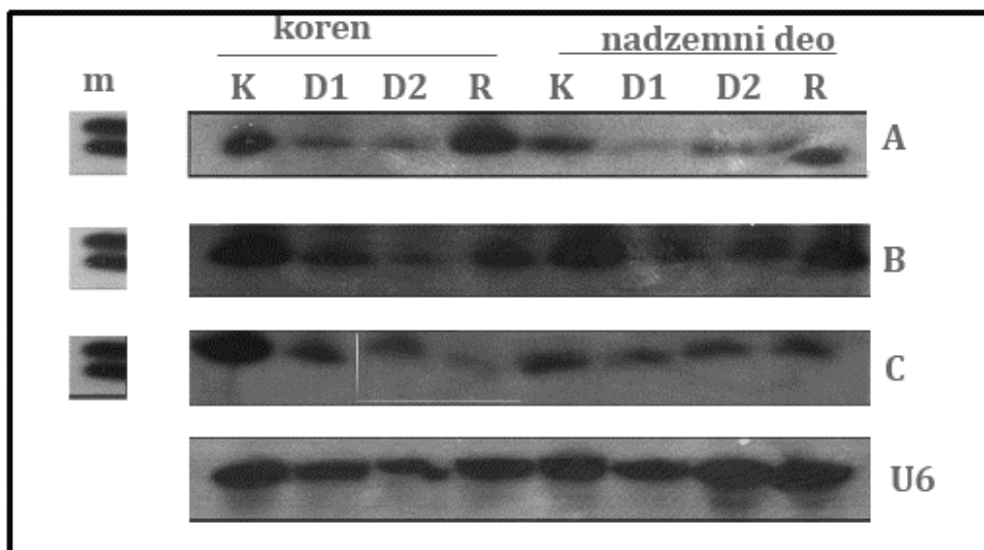
Profil ekspresije miRNK

Analiza ekspresije miRNK miR398a/b i miR408 u korenovima i nadzemnom delu biljke Northern blot metodom

Utvrđivanje profila ekspresije miR398a/b i miR408 kod graška izloženom dehidrataciji urađeno je Northern blot analizom ukupne RNK izolovane iz korenova i nadzemnih delova kontrolnih i tretiranih biljaka (Slika 28). Kao odgovarajuće probe korišćene su komercijalno dostupne LNA probe, dizajnirane na osnovu sekvenci miR398a/b i miR408 iz model leguminoze *M. truncatula*, radioaktivno obeležene. Nakon ekspozicije u trajanju od 5 dana, dobijene su

radiografije prikazane na **Slici 28**. Kao endogena (unutrašnja) kontrola količine RNK korišćena je proba za U6rRNK, takođe radioaktivno obeležena.

Na osnovu radiografija dobijenih nakon odgovarajuće ekspozicije može se zaključiti da sve tri ispitivane miRNK imaju sličan profil ekspresije (**Slika 28**). Kod korenova najveći nivo ekspresije ispitivanih malih RNK-miR398a/b i miR408 zabeležen je kod kontrolnih biljaka, koje su redovno zalivane. Isto je primećeno i u slučaju nadzemnog dela biljke-najviši nivo ekspresije miRNK je kod kontrolnih biljaka. Tokom stresa, odnosno dehidracije, dolazi do progresivnog smanjenja nivoa odgovarajućih miRNK, kako u korenovima, tako i u nadzemnim delu dehidratiranih biljaka.



Slika 28. Northern blot analiza ekspresije miR398a/b i miR408 upotrebom odgovarajućih LNA proba. A-miR398a; B-miR398b; C-miR408; U6-endogena kontrola

Analiza ekspresije target gena miRNK u uslovima dehidracije metodom Real-time PCR

Standardizacija Real-time PCR za gene *CSD*, *COX5b* i *P_{1B}-ATP-aza*

U cilju upotrebe Real-time PCR metode za praćenje ekspresije target gena odgovarajućih miRNK dizajnirani su prajmeri na osnovu dostupnih sekvenci graška, kao i model leguminoze *M. truncatula*. Prajmeri su najpre analizirani u standardnoj PCR reakciji. Proizvodi amplifikacije analizirani su na gelu (slika nije prikazana). Za dalje analize izabrani su prajmeri (**Tabela 1**) koji su dali zadovoljavajuće umnožavanje *CSD*, *COX5b* i *P_{1B}-ATP-aza* gena, bez prisustva nespecifičnih proizvoda. Dalje je određivana efikasnost Real-time PCR reakcija u kojima su ovi prajmeri korišćeni konstruisanjem standardne krive. Standardna kriva je dobijena na osnovu rezultata Real-time PCR u kome su kao matrice korišćene cDNK iz lista graška, a koje su predstavljale sukcesivna razblaženja početne cDNK. Nakon Real-time PCR reakcije automatski su za svaki određen: “BASELINE”, koja obuhvata inicijalne cikluse PCR u kojima postoji vrlo mala promena u jačini fluorescentnog signala; “TRESHOLD”- linija koja prolazi kroz eksponencijalni deo krive amplifikacije, iznad “baseline”; Ct-broj ciklusa u kome fluorescencija prolazi kroz “threshold” i Rn normalizovani reporter – odnos jačine emitovane fluorescence reportera u odnosu na pasivnu reference (ROX). Na grafiku koji prikazuje standardnu krivu, na ordinati su prikazani logaritmi (sa osnovom 10) koncentracija, a na apscisi odgovarajuće Ct vrednosti. Iz jednačine standardne krive određen je njen nagib, a na osnovu nagiba izračunata je i efikasnost primenom jednačine $E = \left(10^{-\frac{1}{\text{nagib}}} - 1\right) \times 100$. Efikasnost PCR reakcija za navedene gene iznosila je 2,1.

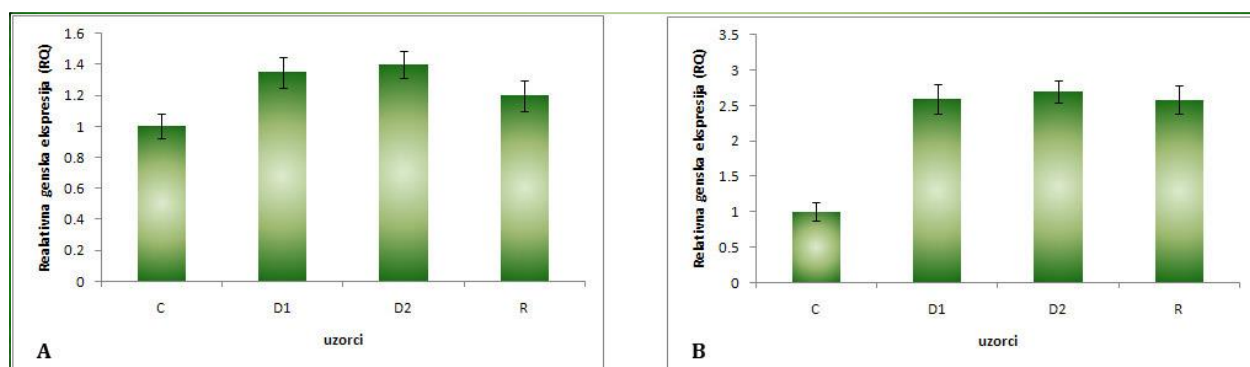
Takođe je urađena i disocijacije proizvoda iz prethodne Real-time PCR amplifikacije kako bi se utvrdilo da li postoji nespecifično umnožavanje u korišćenim cDNK uzorcima. Kriva disocijacije sadži jedan diskretan pik koji nastaje disocijacijom specifičnog proizvoda (slika nije prikazana). Drugi pikovi poreklom od nespecifičnih dvolančanih DNK nisu detektovani, kao ni potencijalni dimeri prajmera, čije su temperature topljenja najčešće oko 76°C.

Kako bi se izvršila relativna kvantifikacija ekspresije odgovarajućih target gena korišćen je, kao referentni gen koji je konstitutivno eksprimiran u svim tkivima i to bez varijacija tokom izlaganja abiotičkom stresu, β -tubulin. Kao i za potencijalne target gene, i za ovaj referentni gen određivana je efikasnost PCR reakcije.

U cilju ispitivanja ekspresije navedenih gena u uslovima stresa, odnosno dehidratacije, kompletno razvijene biljke graška starosti 15 dana podvrgnute su dehidrataciji u trajanju 7 i 10 dana, nakon čega su rehidratirane zalivanjem u trajanju od 24h. Korišćena je cDNK iz listova i korenova kontrolnih i tretiranih biljaka, i to koncentracija koja se pokazala kao optimalna prilikom testiranja efikasnosti prajmera.

Ekspresija CSD gena tokom dehidratacije graška

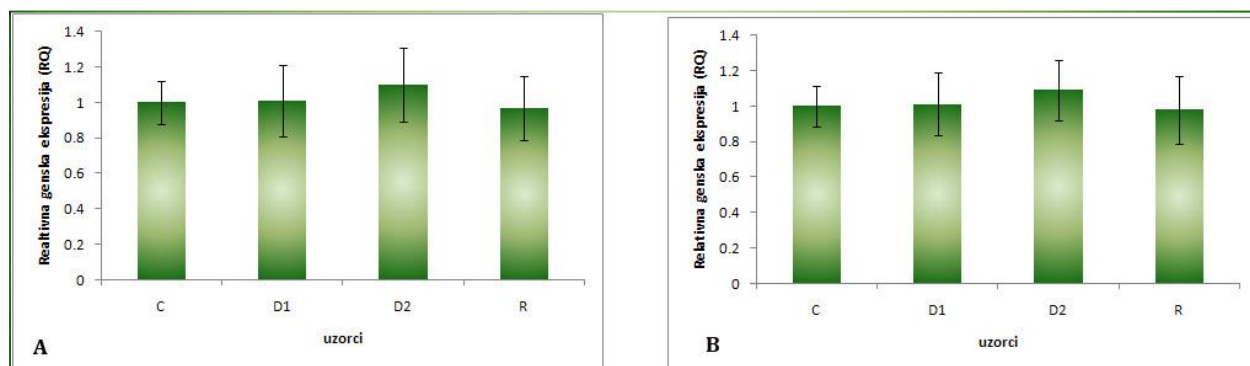
Kvantitativni Real-time PCR, korišćen u analizi ekspresije potencijalnih target gena, pokazuje da vodni deficit menja ekspresiju gena za citosolnu SOD (CSD). Ekspresija ovog gena se povećava i kod korenova i kod nadzemnog dela tretiranih biljaka pod dejstvom dehidratacije (**Slika 29**). Može se zaključiti da je profil ekspresije ovog gena u svim ispitivanim tkivima u inverznoj korelaciji sa profilom ekspresije odgovarajuće miRNK (miR398a/b). Kod korenova tretiranih biljaka dehidratacija dovodi do snažnog skoka u ekspresiji CSD kod tretiranih biljaka, čak 2,5 puta više nego kod kontrolne grupe (**Slika 29B**). Interesantno je da se ovaj nivo ekspresije zadržava i nakon rehidratacije, odnosno da nivo ekspresije CSD na opada odmah nakon prestanka delovanja stresora. U slučaju nadzemnog dela biljaka, dehidratacija takođe dovodi do skoka ekspresije CSD, ali taj skok je nešto manji nego kod korenova. I ovde je količina specifične iRNK kod dehidratiranih biljaka u fazi D₂ slična kao i kod biljaka koje su podvrgnute dehidrataciji u trajanju od 7 dana. Nakon rehidratacije nivo ekspresije CSD ostaje nepromenjen (**Slika 29A**).



Slika 29. Real-time PCR analiza ekspresije *CSD* gena kod graška nakon tretmana dehidracijom: nadzemni deo biljke (A) i korenovi (B). Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

Ekspresija *COX5b* gena tokom dehidracije graška

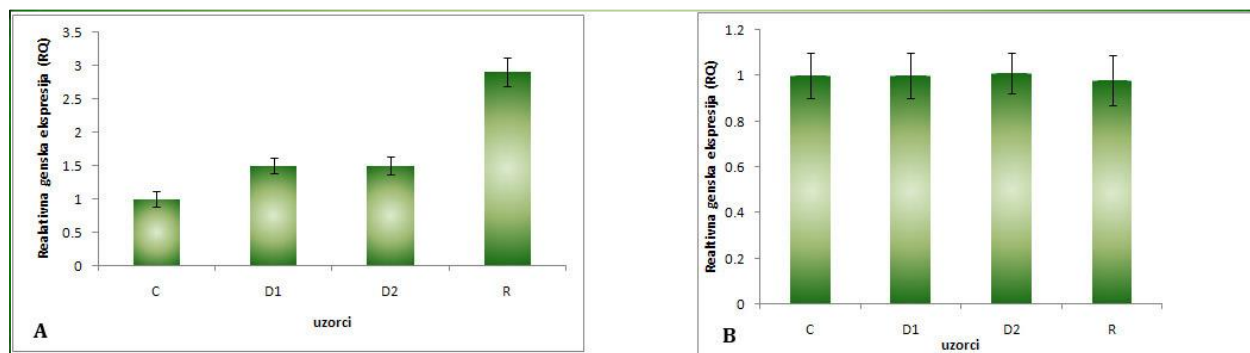
Za razliku od *CSD* gena gde dolazi do promene ekspresije pod delovanjem dehidracije, takav efekat nije zabeležen kod *COX5b* gena (Slika 30). Ni kod korenova, a ni kod nadzemnog dela biljaka koje su dehidratirane u periodu od 7, odnosno 10 dana, nije došlo do promene u zastupljenosti iRNK specifične za subjednicu 5 citohrom c oksidaze. Ovo može ukazivati da ovaj gen zapravo i nije target za miR398, ili da je njegova ekspresija regulisana na neki drugi način.



Slika 30. Real-time PCR analiza ekspresije *COX5b* gena kod graška nakon tretmana dehidratacijom: nadzemni deo biljke (A) i korenovi (B). Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

Ekspresija gena za *P_{1B}-ATP-azu* tokom dehidratacije graška

Potencijalni target za miR408 kod model leguminoze *M. truncatula* jeste gen koji kodira protein iz familije *P_{1B}-ATP-aza*. Ekspresija ovog gena je anlaizirana u korenovima i nadzemnom delu graška koji je podvrgnut dehidrataciji, a nakon 10 dana i rehidrataciji zalivanjem. Ovaj gen kodira protein čija je uloga u transportu metala u različite ćelijske kompartmane, a može biti povezan sa transportom bakra u ćeliji. Analiza ekspresije ovog gena kod graška, upotrebom Real-time PCR metode pokazala je da dehidratacija dovodi do promene u ekspresiji jedino kod nadzemnog dela biljke (Slika 31A). Interesantno je da je najveće povećanje u ekspresiji ovog gena zabeleženo u nadzemnom delu biljaka koje su rehidratirane. Za razliku od nadzemnog dela biljaka, kod korenova kontrolnih i tretiranih biljaka ekspresija ovog gena je prilično ujednačena (Slika 31B).



Slika 31. Real-time PCR analiza ekspresije *P_{1B}-ATP-aza* gena kod graška nakon tretmana dehidratacijom: nadzemni deo biljke (A) i korenovi (B). Vrednosti su generisane iz tri nezavisna merenja i na stubićima su prikazane standardne greške.

DISKUSIJA

Proteinski grašak (*Pisum sativum* L.), odnosno, agronomski tip graška koji se koristi u vidu zrelog zrna bogatog proteinima, počeo je da se gaji na području današnje Srbije početkom osamdesetih godina prošlog veka. Sve do sada stvorene sorte proteinskog graška u Srbiji, odnosno, u Novom Sadu, jare su i u velikom broju godina bivaju izložene ranoprolećnim sušama, što ima ograničavajući uticaj na ostvarenje njihovog genetičkog potencijala za visok i stabilan prinos zrna. Iz tog razloga, tokom poslednje decenije, u Novom Sadu je započet program stvaranja ozimih sorti proteinskog graška, uz unošenje značajne otpornosti na dužinu i jačinu delovanja niskih temperatura tokom zime. Trenutno najnovija novosadska sorta i prva srpska sorta proteinskog graška NS-Mraz, priznata 2011. godine, nastala je pedigre metodom selekcije iz hibridne populacije nastale ukrštanjem genotipova poreklom iz Francuske i Srbije. Ova sorta se odlikuje velikim postotkom preživelih biljaka nakon zime, kao i izraženom ranostasnošću, odnosno, punom zrelošću najmanje sedam dana pre ozimog ječma. Sorta NS-Mraz poseduje genetički potencijal za prinos zrna i do 6 t ha⁻¹, uz sadržaj sirovih proteina od više od 27%. S obzirom da se radi o novoj sorti graška, do sada ne postoje literaturni podaci o odgovoru ove sorte na vodni deficit. Takođe, nema ni podataka o proteinima iz familije DREB transkripcionih faktora kod graška, kao ni o malim RNK kod ove vrste, i njihovoj ulozi u odgovoru na abiotički stres. Zbog toga su podaci dobijeni u ovom istraživanju značajni ne samo za karakterizaciju nove sorte graška-NS mraz, već i kompletne vrste *Pisum sativum*.

Do sada se u najvećoj meri ispitivao odgovor graška na vodni deficit u smislu merenja poljoprivredno značajnih pokazatelja-prinos, sveža i suva masa, LER (*land equivalent ratio*), međutim vrlo je malo literaturnih podataka vezanih za odgovor graška na dehidrataciju, kao i za molekularnu karakterizaciju tog odgovora. U našoj laboratoriji je grašak (*P. sativum*) uveden kao model sistem 2010.god, i od tada počinje intenzivno ispitivanje ne samo odgovora ove značajne vrste na abiotički stres, već i ispitivanje antioksidativnog potencijala semena različitih varijeteta.

U cilju ispitivanja odgovora graška na vodni deficit, izvedeni su preliminarni rezultati u staklari Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Beogradu. Korišćeno je nekoliko različitih vrsta grašaka – *P. sativum*, *P. arvense*, *P. fulvum*, *P. abyssinicum*. Takođe, u okviru iste vrste upotrebljavani su različiti genotipovi. Iako se *P. fulvum* pokazao kao najotporniji na dehidraciju, u smislu da je ova vrsta najduže izdržala bez zalivanja, kao i da je cvetala i donela plod, odlučili smo se da se dalja ispitivanja vrše na vrsti *P. sativum*, i to na novom varijetetu NS mraz.

Biljke stare 15 dana su podvrgnute tretmanima, tako što je ukinuto zalivanje u periodu od 7, odnosno 10 dana. Nakon toga biljke su oporavljene, odnosno rehidratsane, a uzorci su uzeti nakon 24h.

Već na početku dehidracije su postale vidljive promene u boji listova-listovi počinju da gube hlorofil, kao i u turgor, te se polako uvijaju ka unutrašnjosti. Iz literature je poznato da kod graška, kao i kod drugih leguminoza dolazi do redukcije u broju lateralnih korenova dejstvom dehidracije (Grzesiak *et al.*, 1996). Međutim, u eksperimentima na poljskom grašku i na bobu ustanovljeno je da promena u dužini korenova, kao i u broju bočnih korenova pre svega zavisi od vrste, odnosno genotipa koji je korišćen u eksperimentima. Iako nismo merili ni dužinu korenova, kao ni broj bočnih korenova, primetili smo da se kod biljaka koje su izložene vodnom deficitu dužina korenova povećava. Ovo je samo vizuelno zapažanje, tako da su dodatni eksperimenti neophodni da bi se to potvrdilo.

Iako rezultati merenja relativnog sadržaja vode-RWC (**Slika 16**) pokazuju da tokom prve faze dehidracije dolazi do naglog pada RWC, na 40%, a taj pad se nastavlja sa produžetkom dehidracije do desetog dana, na prvi pogled bi se moglo zaključiti da je vrsta koja je korišćena u eksperimentu senzitivna na dehidraciju. Međutim, imajući u vidu da se nakon rehidracije uspostavlja RWC na nivo približan onom koji je zabeležen kod kontrolnih biljaka, ipak se ne može nedvosmisleno zaključiti o tolerantnosti graška NS MRAZ. U prilog ovome ide i činjenica da, iako je često korišćen kao pokazatelj fiziološkog stanja, relativni sadžaj vode u velikoj meri zavisi od temeprature i vlažnosti staništa biljaka.

Pokazano je da dehidracija, kao i mnogi drugi faktori abiotičkog stresa dovode do nastanka oksidativnih oštećenja membrana, a kao rezultat povišene akumulacije reaktivnih vrsta kiseonika. Merenje količine produkovanog malondialdehida (MDA), kao posrednog pokazatelja lipidne peroksidacije, često se upotrebljava kao pokazatelj stepena senzitivnosti, odnosno tolerantnosti biljaka na oštećenja uzrokovana reaktivnim kiseoničnim vrstama (Blokhina *et al.*, 2003). Vendruscolo i saradnici (2007) su pokazali da je kod transgene pšenice otporne na sušu nivo MDA manji za 65% nego kod netransformisanih, senzitivnih biljaka. Sposobnost biljaka da izbegnu oštećenja membrana ili da nastala oštećenja uspešno repariraju od velikog je značaja za preživljavanje uslova vodnog deficita. Posebno je bitno da se održava integritet membrana u koje su ukotvljeni funkcionalno bitni proteini (Bhushan *et al.*, 2007). Dobijeni rezultati pokazuju da dehidracija dovodi do značajnog povećanja nivoa lipidnih peroksida (mereno kao količina MDA) kod graška izloženog uslovima vodnog deficita (**Slika 19**). Ovo je prvi takav podatak, dobijen na grašku, imajući u vidu da je iz literaturnih podataka poznato samo o uticaju povišene koncentracije natrijum hlorida na nivo lipidne peroksidacije kod vrste *P. sativum* (Ahmad *et al.*, 2008).

U cilju dodatne karakterizacije odgovora graška NS MRAZ na dehidraciju izvršeno je i merenje količine akumuliranih reaktivnih vrsta kiseonika u listovima upotrebom fluorescentne boje dihlorofluorescin (Alan and Fluhr, 1997). Dobijeni rezultati (**Slika 18**) pokazuju da je profil akumulacije ukupnih ROS sličan kao i profil lipidne peroksidacije, što nije neočekivano, imajući u vidu da je lipidna peroksidacija proces koga inicira povećana količina ROS.

Ispitivanje odgovora graška na dehidraciju u stakleniku, u uslovima koji su približni uslovima koji vladaju u polju, je po našim saznanjima prvi takav eksperiment. Do sada je ispitivanje odgovora graška na vodni deficit uglavnom vršeno tako što su biljke dehidratirane dejstvom neke osmotski aktivne supstance, kao što je manitol ili polietilen glikol (PEG), ili čak kratkotrajnim sušenjem na filter papiru (Leprince *et al.*, 2000; Buitnik *et al.*, 2000). Koristeći naš eksperimentalni pristup, sa uslovima sličnim onim kojima su biljke izložene u polju, kao i na osnovu rezultata akumulacije ROS, i oštećenja membrana (ustanovljenih preko merenja lipidne peroksidacije), može se pretpostaviti da je korišćena vrsta senzitivna na dehidraciju, iako se

nakon rehidracije uspostavlja RWC sličan onom kod kontrolne grupe biljaka. U prilog ovom zaključku ide i podatak da kod tolerantnih vrsta na sušu ne dolazi do promena u lipidnoj peroksidaciji (Egert and Tevini, 2002).

Nakon otkrića DREB proteina kod arabidospisa i ispitivanja njihove uloge u odgovoru te vrste na abiotički stres, nastavilo se sa ispitivanjem homolognih gena i kod drugih biljaka, uključujući žitarice i leguminoze (Nayak *et al.*, 2009). Iako je podgrupa DREB1 detaljnije ispitivana, nema toliko podataka o DREB2A podgrupi, naročito kod biljnih vrsta koje nisu model sistemi u molekularnoj biologiji, kao što su arabidopsis, pirinač, soja.

U cilju određivanja cDNK koja kodira DREB2A transkripcioni faktor graška primenjen je RT-PCR sa prajmerima dizajniranim na osnovu sekvence DREB2A proteina iz model leguminoze *Medicago truncatula*. Uprkos činjenici da grašak (*P. sativum*) pripada tribusu Viciae, a *M. truncatula* Trifoliae, ipak je moguće koristiti sekvencu *M. truncatula* za dizajniranje prajmera. Osim toga, genom graška je dosta veći od genoma *M. truncatula* (~10 puta), i čini ga 7 pari hromozoma, za razliku od *M. truncatula* koja ima 8 pari hromozoma (Choi *et al.*, 2004). Iz literature je poznato da *DREB2A* gen *M. truncatula* ne sadži introne, tako da se dobija PCR proizvod iste veličine, bilo da se kao matrica koristi genomska DNK ili cDNK. Pokušana je amplifikacija dela genomske DNK koja kodira DREB2A graška, međutim kako nisu dobijeni očekivani rezultati, u daljem ispitivanju se odustalo od tog pristupa. Tako je u PCR reakciji korišćena ukupna cDNK iz dehidratisanih listova (**Slika 20**), imajući na umu da je ovaj protein eksprimiran tokom osmotskog stresa, odnosno dehidracije (Li *et al.*, 2011; Sakuma *et al.*, 2006;). Na ovaj način izolovana je parcijalna cDNK koja kodira DREB2A transkripcioni faktor graška, *PsDREB2A* (**Slika 21**).

Bioinformatička analiza parcijalne cDNK za DREB2A transkripcioni faktor graška, *PsDREB2A*, pokazala je veliki stepen homologije sa sekvencom DREB2A iz *M. truncatula* (DQ908959.1), što je i očekivano, s obzirom da stepen sintenije između te vrste i graška. Nešto manja homologija je sa sekvencom cDNK za DREB2A iz druge leguminoze-soje. Interesantno je da ne postoje podaci o nukleotidnim sekvencama za ovaj transkripcioni faktor drugih vrsta iz

tribusa *Viciae* (sočivo-*Lens culinaris* i bob-*Vicia faba*). Stoga ovi rezultati mogu biti interesantni sa stanovišta potencijalnih filogenetskih analiza.

Kompjuterska analiza izvedene parcijalne proteinske sekvence na osnovu dobijene parcijalne cDNK pokazuje najveću homologiju sa sličnim proteinom iz *M. truncatula* (ABJ88942.1), kao i sa EREBP (ethylene-responsive element binding protein) (XP_003616701.1) iz iste vrste. Takođe, pretragom proteinske sekvence uočeno je prisustvo konzervisanog AP2 domena, što nedvosmisleno ukazuje da se zaista radi o proteinu iz familije DREB. U daljem radu je analizirana ekspresija *PsDREB2A* gena. Za tu svrhu korišćen je kvantitativni Real-time PCR, uz upotrebu TaqMan probe dizajnirane na osnovu dobijene parcijalne sekvence cDNK za *PsDREB2A*. Kao referentni gen, odnosno endogena kontrola, izabran je β -tubulin, a na osnovu literaturnih podataka (Die *et al.*, 2010). U navedenom radu je pokazano da je β -tubulin pogodan za korišćenje kao endogena kontrola u eksperimentima gde se prati ekspresija gena u uslovima abiotičkog stresa, jer ga karakteriše stabilnost ekspresije tokom uslova abiotičkog stresa ($M < 1$). U našim eksperimentu, za praćenje ekspresije *DREB2A* transkripcionog faktora u uslovima vodnog deficita, korišćene su biljke gajene i tretirane u stakleniku, a kompletan tretman dehidratacijom je trajao 10 dana (prva faza 7 dana, dok je faza D₂ trajala 10 dana), a nakon toga biljke su oporavljene zalivanjem. Ovakvi uslovi tretmana, imajući na umu trajanje tretmana, odnosno vremenski okvir u kome je eksperiment izveden, verovatno onemogućuju evaluaciju ekspresije *DREB2A* u najranijim stadijumima odgovora na stres. Međutim, mi smo zainteresovani za ispitivanje promena u ekspresiji gena u periodu koji najbolje reflektuje vremenski okvir u kojem, u poljskim uslovima, vodni deficit počinje da utiče na biljke. Pokazano je da je cirkadijalni sat (ritam) glavni krivac za velike varijacije u ekspresiji gena uključenih u odgovor na hladnoću („cold-responsive transcriptome“), uključujući i *DREB1* gen (Bieniawska *et al.*, 2008). Iako ne postoje literaturni podaci o povezanosti ekspresije *DREB2A* i cirkadijalnog ritma, mi ne možemo sa sigurnošću isključiti mogućnost postojanja takvog vida regulacije. Zbog toga su svi uzorci (koren i nadzemni deo kontrolnih i tretiranih biljaka) sakupljeni u isto vreme (10^h).

Dobijeni rezultati pokazuju da dehidracija dovodi do intenzivnog povećanja ekspresije *PsDREB2A* u korenu tretiranih biljaka graška (**Slika 27A**). Tokom prve faze dehidracije, označene kao D₁ (40%RWC), nivo ekspresije ispitivanog gena je veći nego kod kontrolnih biljaka. Kod biljaka koje su bile 10 dana pod tretmanom, nivo ekspresije *PsDREB2A* je najviši-2,2 puta veći od onog koji je zabeležen kod kontrolnih, redovno zalivanih biljaka. Međutim, interesantno je da rehidracija dovodi do blagog povećanje ekspresije ispitivanog gena, ukazujući da i rehidracija može biti stres za biljke. Pokazano je da kod poikilohidričnih („vaskrsavajućih“) biljaka rehidracija takođe predstavlja specifičan stres za biljke (Jovanović *et al.*, 2011).

Kod nadzemnog dela biljka zabeležen je drugačiji trend ekspresije *PsDREB2A* (**Slika 27B**).

Vodni deficit dovodi do blagog povećanja akumulacije transkripta ispitivanog gena jedino tokom prve faze dehidracije. Gledano numerički, to povećanje je ipak manje nego ono zabeleženo kod korenova. Nakon toga, kod kompletno dehidratiranih biljaka, kao i kod rehidratiranih, dolazi do pada u nivou ekspresije *PsDREB2A*, gledano u odnosu na maksimum koji je zabeležen u fazi D₁. Istovremeno, te vrednosti su veoma bliske vrednostima dobijenih kod kontrolnih biljaka.

Ovakvi rezultati bi mogli ukazivati da DREB2A protein svoju glavnu ulogu, tj. funkciju ispoljava u korenovima biljaka, što je u saglasnosti sa opšte poznatom činjenicom da koren predstavlja primarno mesto percepcije dehidracije, iako ima i drugačijih mišljenja.

Rezultati koji su dobijeni ispitivanjem promena u nivou ekspresije *PsDREB2A* tokom dehidracije graška može se reći da nisu neočekivani. U eksperimentima na hrizantemi (*Dendrathera vestitum*) pokazano je da se ekspresija *DvDREB2A* menja tokom dehidracije, kao i da dostiže maksimalni nivo posle 6h od početka tretmana, ali i da je ta vrednost zadržana i nakon 12h od početka dehidracije (Liu *et al.*, 2008). Jedan od interesnatnih podataka koji su dobijeni na hrizantemi je taj da je zastupljenost transkripta za *DvDREB2A* nakon 2h tretmana manja nego kod kontrolne grupe biljaka. Ipak, treba biti obazriv u interpretaciji takvih rezultata,

s obzirom da su u navedenom eksperimentu autori koristili rastvor PEG 6000 kao agens za izazivanje dehidracije. Neki podaci ukazuju i na to da prekomerna ekspresija DREB2A može u značajnoj meri promeniti otpornost biljaka na stres, naročito na sušu i na osmotski stres izazvan natrijum hloridom (Chen *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2010; Mizoi *et al.*, 2012). Međutim, to pre svega zavisi od vrste iz koje je izolovan *DREB2A* gen. Pokazano je da konstitutivna ekspresija DREB2A kod transgenog arabidopsisa nije dovoljna za indukciju nizvodnih, stresom indukovanih gena (Liu *et al.*, 1998). Analiza proteina je pokazala prisustvo negativnog regulatornog domena (135-165 aminokiselina), a delecija tog regiona pretvara DREB2A u konstitutivno aktivnu formu DREB2A CA (Sakuma *et al.*, 2006). Isti autori su utvrdili da se u okviru negativnog regulatornog domena nalazi PEST sekvenca, signal za degradaciju proteina eukariota (Rogers *et al.*, 1986). Literaturni podaci pokazuju da prisustvo PEST sekvence za degradaciju nije karakteristika svih proteina; kod *Penisetum glaucum*, kao i kod kukuruza nije pronađen takav domen u okviru DREB2A proteina (Agarwal *et al.*, 2010). Zbog toga su DREB2A proteini ovih vrsta izrazito jaki aktivatori nizvodnih ciljnih gena. Transgeni duvan, transformisan sa *PgDREB2A*, pokazuje značajnu toleranciju na dehidraciju izazvanu manitolom, kao i na tretman natrijum hloridom. Takođe, kod transgenih biljaka je zabeleženo i povećanje ekspresije ciljnih gena – *NtERD10B*, *HSP70-3*, *Hsp18p*, *PLC3* i drugih. Chen i saradnici (2007) su pokazali da delecija regiona koji sadrži ostatke Ser i Thr u okviru DREB2A proteina kod *M. truncatula* dovodi do konstitutivne ekspresije proteina. Osim toga, upotrebom jednohibridnog sistema kvasca utvrđeno je da se takva forma proteina veže za DRE i aktivira ekspresiju reporter gena *HIS3* i *Lac Z*. Qin i saradnici (2008) su izolovali DRIP1 (DREB2A Interacting Protein), i pokazali da ovaj protein funkcioniše kao RING E3 ligaza, te je tako negativni regulator ekspresije gena indukovanih sušom. Smatra se da pod normalnim, fiziološkim uslovima, DRIP1 protein interaguje sa DREB2A kod *A. thaliana* i na taj način dovodi do degradacije proteina posredstvom 26S proteazoma. Uprkos činjenici da su biljke, koje su transformisane i koje povećano ekspimiraju DREB2A, otpornije na abiotički stres, ipak postoje i neki nedostaci. Tako, na primer, soja koja povećano ekspimirira konstitutivnu formu *GmDREB2A* zaostaje u rastu, i to na stadijumima klijanja semena i na stadijumu klijanaca (Mizoi

et al., 2012). Kljanci transgena biljke *Medicago truncatula*, sa aktivnom konstitutivnom formom MtDREB2A, pokazuju *dwarf* fenotip.

Na osnovu podataka iz literature (Lata and Prasad, 2011) poznato je da su proteini iz familije DREB2A uključeni u odgovor biljaka na abiotički stres, u kome posrednik nije fitohormon ABA. Međutim, naši preliminarni i neobjavljeni podaci na grašku (*Pisum sativum*), gajenom na hranljivoj podlozi, pokazuju da tretman sa 100 μ M ABA indukuje ekspresiju *PsDREB2A*. Svi ovi podaci ukazuju na postojanje fine regulacije između ekspresije *DREB2A* i nizvodnih puteva. I kod pšenice (*Triticum aestivum* L.), gde postoji više alternativno iskrajanje transkripata za *Wdreb2*, fitohormon ABA dovodi do akumulacije dva transkripta nakon 2h tretmana (Egawa et al., 2006).

S obzirom na to da je proteklih godina došlo do naglog povećanja interesovanja za male RNK i njihovu ulogu, ne samo u odgovoru na abiotički i biotički stres, već i u razviću, razvijeno je niz metoda za identifikaciju mikro RNK kod biljaka. Među brojnim metodama, najveću pažnju su privukle one metode koje se oslanjaju na bioinformatičke analize i predikcije, imajući u vidu da se takve metode mogu koristiti za identifikaciju novih, do sada neotkrivenih mikro RNK, i to nezavisno od uslova pod kojima se ekspimiraju. Međutim, rezultati dobijeni primenom navedenih metoda zahtevaju eksperimentalnu validaciju u smislu analize ekspresije novootkrivenih mikro RNK. Ostali metodi se zasnivaju na kloniranju i sekvenciranju populacije malih RNK prisutnih u jednom određenom organizmu, odnosno pravljenje tzv. Mikro RNK biblioteka. Glavno ograničenje takvih metoda proizilazi iz činjenice da su u dobijenim bibliotekama prisutne male RNK koje su ekspimirane samo pod određenim uslovima (u trenutku izolovanja malih RNK). Osim toga, rezultat često zavisi i od kvaliteta sekvenci kao i od sekvenciranja biblioteka, pa se često dešava da se detektuju samo one populacije malih RNK koje su najzastupljenije. S obzirom na to da za grašak (*Pisum sativum*) ne postoji dostupna sekvenca genoma, nije moguće koristiti bioinformatičke pristupe. Umesto toga, u našim eksperimentima smo se odlučili za ispitivanje ekspresije konzervisanih malih RNK, i to upotrebom *northern blot* metode. Takođe kako nema podataka o ekspresiji miR398a/b i miR408

kod graška u uslovima dehidracije, ovo je prvi eksperiment koji odgovara na pitanja vezana za ulogu navedenih malih RNK u uslovima vodnog deficita.

Za analizu ekspresije konzervisanih malih RNK korišćena je ukupna RNK izolovana iz kontrolnih i tretiranih biljaka, gajenih u staklenoj bašti Instituta za molekularnu genetiku.

Do sada je detaljno analizirana ekspresija miR398a/b i miR408 kod model leguminoze *M. truncatula* (Szittyta *et al.*, 2008; Trindade *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). S obzirom na to da postoji veliki stepen sintenije između graška i *M. truncatula* (Young and Cook, 2004), odlučili smo se da u eksperimentima koristimo odgovarajuće probe koje su dizajnirane na osnovu sekvence pomenute model leguminoze. Osim toga, bioinformatička analiza je pokazala da su miR398a/b i miR408 veoma konzervisane, te je tako moguće koristiti probe dizajnirane na osnovu sekvence iz jedne biljke, za ispitivanje ekspresije kod drugih biljaka.

Upotrebom LNA proba za miR398a/b i miR408, koje su se pokazale kao specifičnije, zbog konformacije nukleotida, otkriveno je da je profil ekspresije navedenih malih RNK isti kako kod korenova tretiranih biljaka, tako i u slučaju nadzemnog dela. Osim toga, zastupljenost specifičnih mikro RNK kod kontrolnih, redovno zalivanih biljaka se razlikuje od one zabeležene kod biljaka koje su izložene vodnom deficitu. Najveća količina malih RNK, miR398a/b i miR408, zabeležena je kod kontrolnih biljaka, i u korenovima i u nadzemnom delu (**Slika 28**). Interesantno je da tretman dehidracijom dovodi do smanjenja nivoa zastupljenosti navedenih malih RNK. Na prvi pogled ovo je veoma čudno, s obzirom na to da postoje literaturni podaci koji pokazuju da vodni deficit povećava ekspresiju ispitivanih malih RNK (Trindade *et al.* 2011; Zhu *et al.*, 2011). Trindade i saradnici (2010) su, ispitujući da li je u odgovoru na dehidraciju *M. truncatula* uključena i regulacija ekspresije gena posredovana malim RNK, ispitivali ekspresiju miR398 i miR408. Upotrebom *northern blot* analize pokazano je da vodni deficit uzrokuje veoma intenzivno povećanje njihove ekspresije. I kod ječma (*Hordeum vulgare*) je pokazano da dehidracija dovodi do povećanja zastupljenosti miR408 nakon 4h i 8h tretmana (Kantar *et al.*, 2011). Jia i saradnici (2009) su takođe pokazali da se zastupljenost miR398a/b povećava u uslovima vodnog deficita, povišene koncentracije natrijum hlorida, kao i nakon tretmana fitohormonom ABA. Razlika u navedenim rezultatima, i onima koje smo mi dobili u

našim eksperimentima, se može objasniti različitim stepenom dehidracije kojem su biljke bile izložene. Osim toga, i različite biljne vrste koje su korišćene u eksperimentima mogu biti odgovorne za navedeno neslaganje u rezultatima. Međutim, i kod *M. truncatula* je nedavno pokazano da dehidracija uzrokuje smanjenje ekspresije miR398 (Wang *et al.*, 2011). Jedno od objašnjenja koje su autori ponudili da bi objasnili svoje rezultate jeste taj da tip tretmana, kao i trajanje tretmana (koje varira od nekoliko časova pa do nekoliko dana) ima bitan uticaj na nivo zastupljenosti malih RNK. U našim eksperimentima, koji su slični kao i oni koje su izveli Wang i saradnici (2011), tretman je trajao 7, odnosno 10 dana, te su izložene različitim stepenima dehidracije. Slične eksperimente su izvodili i drugi autori (Zheng *et al.*, 2004; Gazendam and Oelofse, 2007). Osim ovakvih eksperimenata, u kome je dehidracija izazivana ukidanjem zalivanja, postoje i eksperimenti u kojima je praćena ekspresija malih RNK, a gde je vodni deficit izazivan tretmanom manitolom ili PEG-om, tokom različitog vremena (Zhao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Međutim, veoma je teško porediti rezultate dobijene u uslovima koji su slični onima koji vladaju u prirodi (gde je dehidracija izazvana promenom vodnog potencijala zemljišta) sa onima dobijenim dejstvom neke osmotski aktivne supstance, s obzirom na to da se u takvim eksperimentima razlikuje vodni deficit, u smislu brzine postizanja određenog vodnog potencijala, kao i od stepena oštećenja koje takav stres uzrokuje (Wang *et al.*, 2011).

Jedan od propratnih efekata delovanja abiotičkog stresa na biljke jeste i akumulacija reaktivnih vrsta kiseonika (Gill and Tuteja, 2010; Velaskueze-Faire *et al.*, 2011). Jedan od enzima koji učestvuje u detoksifikaciji ćelija od ROS jeste i superoksid dismutaza (SOD), koja vrši dismutaciju superoksid anjon radikala. Targeti za miR398 su 2 forme SOD-citosolna i hloroplastna, a pokazano je i da oksidativni stres dovodi do smanjenja količine transkripata miR398 (Sunkar *et al.*, 2006). Kod biljaka je oksidativni stres često pratilac i vodnog deficita. U našim eksperimentima je pokazano da dehidracija smanjuje količinu transkripta za miR398, što bi moglo da dovede do povećanja ekspresije SOD. Ovakav efekat dehidracije na ekspresiju miR398 je u saglasnosti sa podacima dobijenim na kukuruzu (Wei *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011), ali se razlikuje od onih dobijenih na *M. truncatula* (Trindade *et al.*, 2010; Kantar *et al.*, 2011). Na osnovu ekspresionog profila *CSD1* gena (**Slika 29**) moglo bi da se zaključi da je ovaj gen potencijalni target za miR398 kod graška, imajući na umu činjenicu da je njegova ekspresija

u obrnutoj korelaciji sa ekspresijom navedene male RNK. Sa druge strane, rezultati koji su dobijeni merenjem nivoa MDA i količine akumuliranih ROS nedvosmisleno ukazuju na postojanje oksidativnog stresa tokom dehidracije graška, tako da nije nočekivano da se u takvim uslovima poveća ekspresija jednog od enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu. Pokazano je da su targeti miR398a/b i miR408 geni koji kodiraju proteine koji sadrže bakar, i da mogu imati ulogu o održavanju homeostaze bakra kod *A. thaliana* (Yamasaki *et al.*, 2007; Abdel-Ghany and Pilon, 2008). Ovi autori pretpostavljaju da u uslovima gde je ograničena dostupnost bakra dolazi do smanjenja ekspresije *CSD1* i *COX5b* gena. Međutim, kako ne postoje podaci o ulozi bakra tokom dehidracije graška, teško je izvoditi nekakve zaključke vezane za homeostazu tog metala u uslovima vodnog deficita. Osim toga, u našim eksperimentima je pokazano da se ekspresija subjednice 5 citohrom c oksidaze (*COX5b*) značajno ne menja tokom tretmana, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (**Slika 30**). To može ukazivati da tokom dehidracije graška nema promene u količini bakra, ili pak da navedeni gen nije target za miR398.

Dalje je u eksperimentima ispitivana i ekspresija potencijalnog targeta miR408 - P_{1B}-ATP-aze. Iako se količina miR408 menja tokom dehidracije (smanjuje se u uslovima vodnog deficita), nivo ekspresije potencijalnog targeta gena za navedenu mikro RNK se menja samo u nadzemnim delovima tretiranih biljaka, dok kod korenova ostaje nepromenjen, kada se poredi sa nivoom zabeleženim kod kontrolne grupe biljaka (**Slika 31**). Očigledno je da ovaj gen može biti regulisan posredstvom miR408, ali je neophodno sprovesti i dodatne ekperimente koji bi to potvrdili. Mikro RNK miR398 i miR408, zajedno sa miR397 i miR 857 čine familiju tzv. “bakar mikro RNK” (Burkhead *et al.*, 2009). Smatra se da ove male RNK učestvuju u regulaciji količine ne-esencijalnih proteina koji sadrže bakar, smanjujući ih, čuvajući na taj način bakar koji bi bio dostupan plastocijaninu (Yamasaki *et al.*, 2007; Abdel-Ghany and Pilon, 2008).

Naši rezultati ukazuju da bi bilo interesantno dodatno ispitati postojanje veze između odgovora graška (*P. sativum*) na vodni deficit (i to u uslovima sličnim poljskim), malih RNK i homeostaze metala, posebno bakra. Takođe, ispitivanja na različitim varijetetima graška bila bi od velikog značaja.

ZAKLJUČCI

1. Parcijalna cDNK koja kodira transkripcioni faktor iz familije DREB2A, *PsDREB2A* (495 bp) izolovana je upotrebom prajmera na osnovu sekvence *DREB2A* gena iz model leguminoze *Medicago truncatula*. Dobijena sekvenca je deponovana u Gene Bank (HM229349).
2. Kompjuterska analiza parcijalne cDNK pokazala je da je dobijena sekvenca najbližnja sa sekvencom za *DREB2A* iz *M. truncatula*, kao i sa *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) iz iste vrste.
3. Analiza izvedene aminokiselinske sekvence je pokazala da *PsDREB2A* ima strukturu karakterističnu za DREB2A proteine-prisustvo konzervisanog AP2 domena (17-55 ak).
4. Utvrđeno je prisustvo jednog potencijalnog mesta za sumoilaciju proteina, i to na poziciji Lys157 (MKQE). Takođe, utvrđeno je i prisustvo nekoliko potencijalnih mesta za fosforilaciju najverovatnije protein kinazom A.
5. Metodom Real-time PCR su detektovane promene u ekspresiji *PsDREB2A* tokom dehidracije i rehidracije graška. Kod korena najizrazitije povećanje ekspresije je utvrđeno nakon 10 dana dehidracije. Nakon rehidracije nivo ekspresije *PsDREB2A* se smanjuje, ali je viši u odnosu na kontrolne biljke. Kod nadzemnog dela biljke profil ekspresije *PsDREB2A* je drugačiji u odnosu na koren. Maksimalni nivo ekspresije zabeležen je nakon 7 dana tretmana. Sa daljom dehidracijom, kao i kod rehidratiranih biljaka, nivo ekspresije nije statistički značajno različit od onog koji je izmeren kod kontrolne grupe biljaka.
6. Upotrebom *Northern blot* metode ispitivana je ekspresija konzerviranih mikro RNK-miR398a/b i miR408 tokom dehidracije i rehidracije graška. Kod korenova najveći nivo ekspresije ispitivanih malih RNK-miR398a/b i miR408 zabeležen je kod kontrolnih biljaka, koje su redovno zalivane. Isto je primećeno i u slučaju nadzemnog dela biljke-najviši nivo ekspresije miRNK je kod kontrolnih biljaka. Tokom stresa, odnosno

dehidracije, dolazi do progresivnog smanjenja nivoa odgovarajućih miRNK, kako u korenovima, tako i u nadzemnim delu dehidratiranih biljaka.

7. Metodom Real-time PCR su detektovane promene u ekspresiji potencijalnih target gena ispitivanih mikro RNK – *CSD*, *COX5b* i *P_{1B}-ATP-aza*. Od navedenih gena jedino kod *COX5b* gena nije utvrđena promena u nivou zastupljenosti iRNK tokom dehidracije i rehidracije biljaka. Primećeno je da je ekspresija *CSD* gena u inverznoj korelaciji sa ekspresijom odgovarajuće miRNK, tako da je najniži nivo ekspresije zabeležen kod kontrolne grupe biljaka, dok se pod tretmanima nivo ekspresije *CSD* povećava. Ekspresija *P_{1B}-ATP-aze* je promenjena dejstvom dehidracije jedino kod nadzemnog dela biljaka, a najveća promena je zabeležena kod rehidratiranih biljaka. U slučaju korenova ekspresija ovog gena je nepromenjena.

LITERATURA

1. Abdel-Ghany, SE and Pilon, M (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 283: 15932-15945.
2. Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15: 63–78.
3. Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131: 3357–3365.
4. Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25: 1263-1274.
5. Agarwal P, Agarwal PK, Nair S, Sopory SK, Reddy MK (2007) Stress inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA binding activity. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 189–198.
6. Agarwal P, Agarwal P, Joshi A, Sopory S, Reddy M (2010) Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Molecular Biology Reporter* 37: 1125-35.
7. Agarwal PK, Jha B (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum* 54: 201-212.
8. Ahmad P, John R, Sarwat M, Umar S (2008) Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal Of Plant Production* 4, 353-365.

9. Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* 9: 841-857.
10. Allan AC, Fluhr R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559-1572.
11. Allen E, Xie Z, Gustafon AM, Carrington JC (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
12. Almoguera C, Prieto-Dapena P, Díaz-Martín J, Espinosa JM, Carranco R, Jordano J (2009) The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. *BMC Plant Biology* 9:75 doi:10.1186/1471-2229-9-75.
13. Ambros, V, Chen, C (2007) The regulation of genes and genomes by small RNAs *Development*, 34: 1635-41.
14. Araki S, Ito M, Soyano T, Nishihama R, Machida Y (2004) Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32979–88.
15. Arenas-Huertero C, Pérez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology* 70: 385–401.
16. Aubert G, Morin J, Jacquin J, Loridon K, Quillet MC et al. (2006) Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1024–1041.
17. Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 15: 2730–2741.
18. Axtell MJ, Bowman JL (2008) Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in Plant Science* 13: 343-349.

19. Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Austral Journal of Biological Science* 15: 413-428.
20. Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21:1–36.
21. Bhushan D, Pandey A, Choudhary MK, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2007) Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1868–1884.
22. Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, Hannah MA (2008) Disruption of the Arabidopsis circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiology* 147: 263-79
23. Blokhina O, Violainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179–194.
24. Boguszewska D, Zagdańska B (2012) ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions, Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0554-1, InTech, Croatia.
25. Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations--making metabolism move. *Current Opinion in plant Biology* 1: 267-274.
26. Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, Bressan RA, Burnap RL, Cushman JC, Cushman MA, Deyholos M, Fisher R, Galbraith DW, Hasegawa PM, Jenks M, Kawasaki S, Koiwa H, Koreeda S, Lee BH, Michalowski CB, Misawa E, Nomura M, Ozturk N, Postier B, Prade R, Song CP, Tanaka Y, Wang H, Zhu JK (2001). A genomic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:295–311.
27. Borevitz JO, Xia YJ, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12: 2383–2393.

28. Bota J, Flexas J, Medrano H (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, 162: 671–681.
29. Boutet S, Vazquez F, Liu J, Béclin C, Fagard M, Gratias A, Morel JB, Crété P, Chen X and Vaucheret H (2003) *Arabidopsis* HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* 13: 843–848.
30. Bray EA (1994) Alterations in gene expression in response to water deficit. In *Stress-Induced Gene Expression in Plants* (Basra, A.S., ed.). Amsterdam: Harwood Academic, pp.1–23.
31. Bray EA, Bailey-Serres J, and Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem W, and Jones RL, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), pp. 1158–1203.
32. Brodersen P, Voinet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 141-148.
33. Buitnik J, Leprince O, Hoekstra F(2000) Dehydration-induced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 124, 1413–1425.
34. Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol* 182: 799-816.
35. Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37: 425-435.
36. Carvalho MH, Laffray D, Louguet P (1998) Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environmental and Experimental botany*, 40: 197–207.

-
37. Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja V, Carrington JC (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibits the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development* 18, 1179-1186.
 38. Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239-264.
 39. Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ (2007) GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353: 299-305.
 40. Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303: 2022-2025.
 41. Chen Y, Yang X, He K, Liu M, Li J, Gao Z, Lin Z, Zhang Y, Wang X, Qiu X, Shen Y, Li Z, Deng X, Luo J, Deng X-W, Chen Z, Gu H, Qu L-J (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology* 60: 107-124.
 42. Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55: 225-236.
 43. Chinnusamy V, Gong Z, Zhu JK (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1187-1195.
 44. Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 1723-1730.
 45. Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss G, Young N, Cook D (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 43: 15289-15294.
-

-
46. Collen J, Davison IR (1997) In vivo measurement of active oxygen production in the brown alga *Fucus evanescens* using 2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate. *Journal of Phycology* 33: 643-648.
 47. Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta SL, Tonelli C (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology* 15: 1196–1200.
 48. Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C (2008) Overexpression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal* 53: 53–64.
 49. Covarrubias, AA, Reyes, JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment* 33: 481-489.
 50. Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Reviews in Plant Biology* 61: 651-679.
 51. Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, Chong K (2007) Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology* 143: 1739-1751.
 52. Denekamp M, Smeekens SC (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiology* 132: 1415–1423.
 53. Die JV, Roman B, Nadal S, Gonzales-Verdejo C (2010) Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232: 145-153.
 54. Diederichs S, Haber DA (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131: 1097-108.

-
55. Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D (2009) Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics & Genomics* 36: 17–29.
 56. Doré C, Varoquaux F (2006) Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Page 840 (Q. Ed., Ed.). Paris.
 57. Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33: 751–763.
 58. Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto A, Himber C, Voinnet O (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16:1235-1250.
 59. Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S (2006) Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetic System* 81: 77-91.
 60. Egert M, Tevini M (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* 48: 43-49
 61. Fang Y, Spector, DL (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Current Biology*, 17: 818–823.
 62. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy of Sustainable Development* 29: 185–212.
 63. Fowler S, Thomashow MF (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* 14: 1675–1690.
-

-
64. Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics* 39: 1033–1037.
 65. Frazier TP, Sun G, Burklew CE, Zhang B (2011) Salt and Drought Stresses Induce the Aberrant Expression of microRNA Genes in Tobacco. *Molecular Biotechnology* 49:159-165.
 66. Fujita M, Mizukado S, Fujita Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Matsui M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale full length cDNA over-expressor (FOX) gene hunting system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364: 250-257.
 67. Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Masaru OT, Kazuo S, Kazuko YS (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 3470-3488.
 68. Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Abscisic acid dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 1988–1993.
 69. Gazendam I, Oelofse D (2007) Isolation of cowpea genes conferring drought tolerance: Construction of a cDNA drought expression library. *Water SA* 33: 387-391.
 70. Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
 71. Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000) Overexpression of Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124: 1854–1865.
-

-
72. Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P, Bouvier-Durand M, Vartanian N (1994) Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557–1577.
73. Gong W, Shen YP, Ma LG, Pan Y, Du YL, Wang DH, Yang JY, LD Hu, Liu XF, Dong CX, Ma L, Chen YH, Yang XY, Gao Y, Zhu D, Tan X, Mu JY, Zhang DB, Liu YL, Dinesh-Kumar SP, Li Y, Wang XP, Gu HY, Qu LJ, Bai SN, Lu YT, Li JY, Zhao JD, Zuo J, Huang H, Deng XW, Zhu YX (2004) Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes. *Plant Physiology* 135: 773-782.
74. Grzesiak, S, Filek, W, Skrudlik, G, Niziol, B (1996) Screening for drought tolerance: evaluation of seed germination and seedling growth for drought resistance in legume plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* 177: 245-252.
75. Guddeti S, Zhang DC, Li AL, Leseberg CH, Kang H, Li XG, Zhai WX, Johns MA, Mao L (2005) Molecular evolution of the rice miR395 gene family. *Cell Research* 15: 631-8.
76. Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* 17: 1376-1386.
77. Guo Y, Gan S (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence *The Plant Journal* 46: 601-612.
78. Gupta K, Agarwal PK, Reddy MK, Jha B (2010) SbDREB2A, an A-2 type DREB transcription factor from extreme halophyte *Salicornia brachiata* confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. *Plant Cell Reports* 29: 1131-1137.
79. Haley B, Zamore PD (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 599-606.
80. Heath RL, Packer L (1986) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
-

-
81. Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S, Lydiate, D (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* 53: 383-397.
 82. Hsiao TC (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519-570.
 83. Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li Xianghua, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 12987–12992.
 84. Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 67: 169-181.
 85. Hussain SS, Kayani MA, Amjad M (2011) Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants. *American Institute of Chemical Engineers* DOI: 10.1002/btpr.514.
 86. Jagadeeswaran, G, Saini, A and Sunkar, R (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta* 229: 1009-1014.
 87. Jain D, Roy N, Chattopadhyay D (2009) CaZF, a plant transcription factor functions through and parallel to HOG and calcineurin pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to provide osmotolerance. *PLoS One* 4: e5154.
 88. Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7: 106-111.
 89. Jia X, Wang WX, Ren LG, Chen QG, Mendu V, Willcut B, Dinkins R, Tang XQ, Tang GL (2009) Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 71: 51-59.
-

-
90. Jin H, Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology* 41: 577–585.
 91. Jones-Rhoades, MW, Bartel, DP, Bartel, B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19–53.
 92. Jovanović, Ž, Rakić, T, Stevanović, B, Radović, S (2011) Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathaliae*. *Plant Growth Regulation* 64: 231-240.
 93. Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ (2008) Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology* 146: 623–635.
 94. Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 14: 343–357.
 95. Kantar, M, Unver, T and Budak, H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional & Integrative Genomics* 10: 493-507.
 96. Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233: 471-484.
 97. Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsch-Martinez N, Krishnan A, Nataraja KA, Udayakumar M, Pereira A (2007). Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 15270–15275.
 98. Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287–291.

-
99. Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozlic J, Meglic V (2007) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159–172.
100. Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito, K, Takahashi H et al. (2009) Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant Journal* 57: 313 – 321.
101. Kim J, Jung JH, Reyes JL, Kim YS, Kim SY, Chung KS, Kim JA, Lee M, Lee Y, Narry Kim V, Chua NH, Park CM (2005) microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *The Plant Journal* 42: 84–94.
102. Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal* 40: 75-87.
103. Kim T-H, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Reviews in Plant Biology* 61: 561–591.
104. Kizis D, Pagès M (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal* 30: 679-689.
105. Klempnauer K.-H, Gonda TJ, Bishop JM (1982) Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: The architecture of a transduced oncogene. *The Cell* 31: 453-463.
106. Kliebenstein, DJ, Monde, RA and Last, RL (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118: 637-650.
107. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12:206–212.
-

-
108. Lata C, Yadav A, Prasad M (2011a) Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. pp.269-296. In: Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives, Prof. Arun Shanker (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech, Croatia
 109. Lata C, Bhutty S, Bahadur RP, Majee M, Prasad M (2011b) Association of a SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. Journal of Experimental Botany DOI: 10.1093/jxb/err016.
 110. Lata C, Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of Experimental Botany, 62: 4731-48.
 111. Lee SJ, Kang JY, Park HJ, Kim MD, Bae MS, Choi HI, Kim SY (2010) DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. Plant Physiology 153: 716–727.
 112. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim N (2003) The nuclear Rnase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425: 415-419.
 113. Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA (2000) Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. Plant Physiology 122: 597–608.
 114. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3' end uridylation activity in Arabidopsis. Current Biology, 15: 1501–1507.
 115. Li X, Cheng X, Liu J, Zeng H, Han L, Tang W (2011) Heterologous expression of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 gene enhances drought and freezing tolerance in transgenic *Lolium perenne* plants. Plant Biotechnological Report 5: 61–69.
 116. Li, T, Li, H, Zhang, YX and Liu, JY (2010) Identification and analysis of seven H₂O₂-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L.ssp. *indica*). Nucleic Acids Research 39: 2821-2833.
-

-
117. Liang YK, Dubos C, Dodd IC, Holroyd GH, Hetherington AM, Campbell MM (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 15: 1201–1206.
 118. Liao Y, Zou HF, Wang HW, Zhang WK, Ma B, Zhang JS (2008) Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Cell Research* 18: 1047-1060.
 119. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP (2003) Vertebrate miRNA genes. *Science* 299: 1540.
 120. Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-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*. *The Plant Cell* 10: 391–406.
 121. Liu, HH, Tian, X, Li, YJ, Wu, CA and Zheng, CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14: 836-843.
 122. Livak K, Schmittgen D (2011) Analysis of Relative Gene Expression Data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
 123. Lu, S, Sun, YH and Chiang, VL (2008) Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant Journal* 55: 131-151.
 124. Lv, DK, Bai, X, Li, Y, Ding, XD, Ge, Y, Cai, H, Ji, W, Wu, N and Zhu, YM (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* 459: 39-47.
 125. Magnani E, Sjölander K, Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *The Plant Cell* 16: 2265–2277.
 126. Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
-

-
127. Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology* 14: 1035–1046.
 128. Mallory A, Vaucheret H (2010) Form, function and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22: 3879-3889.
 129. Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 185–196.
 130. Medina J, Bargues M, Terol J, Pérez-Alonso M, Salinas J (1999) The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119: 463–469.
 131. Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG (2006) MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA* 12: 1612-1619.
 132. Mizoi J, Ohori T, Moriwaki T, Kidokoro S, Todaka D, Maruyama K, Kusakabe K, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) GmDREB2A;2, a canonical DREB2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates DRE-dependent gene expression. *Plant Physiology* doi:10.1104/pp.112.204875.
 133. Moldovan D, Spriggs A, Yang J, Pogson BJ, Dennis ES, Wilson IW (2010) Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 61: 165-177.
 134. Montgomery T, Howell M, Cuperus J, Li D, Hansen J, Alexander A, Chapman E, Fahlgren N, Allen E, Carrington J. (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133: 128–141.

-
135. Morishita T, Kojima Y, Maruta T, Nishizawa-Yokoi A, Yabuta Y, Shigeoka S (2009) Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. *Plant Cell Physiology* 50: 2210-2222.
 136. Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology* 140: 411–432.
 137. Nakashima K, Shinwar ZK, 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 Molecular Biology* 42: 657–665.
 138. Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Regulons involved in osmotic stressresponsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 62–71.
 139. Nakashima K, Tran LSP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630.
 140. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*: 312:436-439
 141. Nayak S, Balayi J, Upadhyaya H, Hash C, Kishor P, Chattopadhyay D, Rodrigez L, Blair M, Baum M, McNally K, This D, Hoisington D, Varshney R (2009) Isolation and sequence analysis of DREB2A homologues in three cereal and two legume species. *Plant Science* 177: 460-467.
 142. Nelson D. et al. (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 104: 16450–16455.
 143. Newman LJ, Perazza DE, Juda L, Campbell MM (2004) Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype. *The Plant Journal* 37: 239–50.
-

-
144. Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & Development* 21: 750-755.
 145. Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005) Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138: 341–351.
 146. Palatnik, J, Allen E, Wu X, Schwab R, Carrington J, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
 147. Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35: e60.
 148. Parizotto E, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O (2004) *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes & Development* 18: 2237–2242.
 149. Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 102: 3691–3696
 150. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12: 1484–1495.
 151. Pasquali G, Biricolti S, Locatelli F, Baldoni E, Mattana M (2008) Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Reports* 27: 1677-1686.
 152. Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H (1987) The regulatory locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO f.* 6: 3553-3558.
-

-
153. Pinheiro GL, Marques CS, Costa MDBL, Reis PAB, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EPB (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444: 10-23.
154. Poethig, RS, Peragine A, Yoshikawa M, Hunter C, Willmann M, Wu G. (2006) The function of RNAi in plant development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71, 165-17060 4.
155. Pouch-Pélissier MN, Pélissier T, Elmayan T, Vaucheret H, Boko D, Jantsch MF, Deragon JM (2008) SINE RNA induces severe developmental defects in *Arabidopsis thaliana* and interacts with HYL1 (DRB1), a key member of the DCL1 complex. *PLoS Genet* 4: e1000096 doi: 10.1371/journal.pgen.1000096.
156. Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal* 50: 54–69.
157. Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T et al. (2008) *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 20: 1693-707.
158. Qiu Y, Yu D (2009) Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany* 65: 35-47.
159. Reyes, JL, Chua, NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal* 49: 592-606.
160. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*: 110: 513–520.
161. Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, PilgrimM, Broun P, Zhang JZ,
-

- Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factor: genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105–2110.
162. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
163. Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes & Development* 12: 198-207.
164. Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stressresponsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 103: 18822–18827.
165. Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) *Molecular cloning: a laboratory Manual*, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
166. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of National Academy of Science of USA* 74: 5463-5467.
167. Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279–292.
168. Seki M, Kamei A, Satou M, Sakurai T, Fujita M, Oono Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Transcriptome analysis in abiotic stress conditions in higher plants. *Topics in Current Genetics* 4: 271–295.
169. Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 296-302.

-
170. Shen Q, Zhang P and Ho T (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107–1119.
171. Shen YG, Zhang WK, Yan DQ, Du BX, Zhang JS, Liu Q, Chen SY (2003) Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 155–161.
172. Shin D, Moon SJ, Han S, Kim BG, Park SR, Lee S-K, Yoon HJ, Lee HE, Kwon HB, Baek D, Yi BY, Byun MO (2011) Expression of StMYB1R-1, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance. *Plant Physiology* 155: 421-432.
173. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress tolerance and response. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.
174. Shukla RK, Tripathi V, Jain D, Yadav RK, Chattopadhyay D (2009) CAP2 enhances germination of transgenic tobacco seeds at high temperature and promotes heat stress tolerance in yeast. *FEBS Journal* 276: 5252-5262.
175. Singh AK, Sopory SK, Wu R, Singla-Pareek SL (2010) Transgenic Approaches. In: *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert and Govindjee (eds.), pp.417–450.
176. Sire C, Moreno AB, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, San Segundo B (2009) Diurnal oscillation in the accumulation of *Arabidopsis* microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. *FEBS Letters* 583: 1039-1044.
177. Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, et al. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9: 4-18.
178. Souer E, Van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *The Cell* 85: 159-170.
-

-
179. Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular Cell* 15: 173-183.
180. Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 94: 1035–1040.
181. Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
182. Sunkar, R, Kapoor, A and Zhu, JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18: 2051-2065.
183. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu K (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* 12:301-309.
184. Szittya G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Fevereiro MP, Moulton V, Dalmay T (2008) High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics* 9: 593.
185. Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc.
186. Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology* 49: 493-500.
187. Tanguilig VC, Yambao EB, O'toole JC, De Datta SK (1987) Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. *Plant and Soil*, 103: 155-168.
188. Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, 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. *The Plant Cell* 16: 2481-2498.
189. Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Co-expression of the stressinducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 46–63.
190. Trindade, I, Capitaio, C, Dalmay, T, Fevereiro, MP and Santos, DM (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231: 705-716.
191. Trinidad I, Santos D, Dalmay T, Feveriero P (2011) Facing the environment: small RNAs and the regulation of gene expression under abiotic stress in plants. In: Shanker A and Venkateswarlu B (eds.) *Abiotic Stress response in plants-physiological, biochemical and genetic perspectives*, InTech, Croatia, pp 113-136
192. Trujillo LE, Sotolongo M, Menendez C, Ochogava ME, Coll Y, Hernandez I, Borrás-Hidalgo O, Thomma BPHJ, Vera P, Hernandez L (2008) SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. *Plant Cell Physiology* 49: 512–515.
193. Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanri O, Murray J, Andraiankaja A, Zhang J-Y, Benedito V, Hofer JMI, Cheng F, Town CD (2007) Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology* 144: 538-549.
194. Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) SRK2C. A SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stressresponsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101: 17306–17311.

-
195. Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 113-122.
196. 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. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 97: 11632–11637.
197. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development* 20: 515.
198. van Kan JAL, Joosten MHAJ, Wagemakers CAM, van den Berg-Velthuis GCM, de Wit PJGM (1992) Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513–517.
199. Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I (2004) Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal* 37: 115–127.
200. Vannini M, Campa M, Iriti M, Genga A, Faoro F, Carravieri S, Rotino GL, Rossoni M, Spinardi A, Bracale M (2007) Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice *Osmyb4* gene. *Plant Science* 173: 231-239.
201. Vaucheret H, Vazquez F, Crété P, Bartel DP (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development*: 18 :1187-1197.
202. Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Crété P (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell* 16:69-79.
-

-
203. Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, Boller T, Meins F Jr (2008) Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Research* 36: 6429-6438.
204. Velaskueze-Faire S, Guerra-Rodriguez R, Calderon-Sanchez L (2011) Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. In: Shanker A and Venkateswarlu B (eds.) *Abiotic Stress response in plants-physiological, biochemical and genetic perspectives*, InTech, Croatia, pp 3-26.
205. Vendruscolo ACG, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marur CJ, Vieira LGC (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164: 1367-1376.
206. Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.
207. Wang H, Hao J, Chen X, (2007) Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Molecular Biology* 65: 799-815.
208. Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C (2008) Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology* 67: 589–602.
209. Wang T, Chen L, Zhao M, Tian Q, Zhang WH (2011) Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high throughput sequencing. *BMC Genomics* 12: 367.
210. Wei LY, Zhang DF, Xuang F, Zhang ZX (2009) Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *International Journal of Plant Science* 170: 979-989.
211. Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131: 915-922.
-

-
212. Winicov I, Bastola DR (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiology* 120: 473–480.
213. Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L (2008) Characterization of Osb-ZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology* 148: 1938–1952.
214. Xie DY, Sharma SB, Wright E, Wang ZY, Dixon RA (2006) Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *The Plant Journal* 45: 895–907.
215. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003) Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Current Biology*, 13(9):784-789.
216. Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5):E104.
217. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology*, 138(4):2145-2154.
218. Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M (2005) Transcription factors in rice: a genomewide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology* 59: 191-203.
219. Xu ZS, Ni ZY, Li ZY, Li LC, Chen M, Gao DY, Yu XD, Liu P, Ma YZ (2009) Isolation and functional characterization of HvDREB1-a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. *Journal of Plant Research* 122: 121–130.
220. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration-stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 238: 17–25.
-

-
221. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6: 251-264.
222. Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 16369-16378.
223. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X (2006) HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, 34:667–675.
224. Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology* 60: 107–124.
225. Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61: 672–685.
226. Young N, Cook D (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of National Academy of Science of U S A* 43: 15289-15294.
227. Yu B, Bi L, Zheng B, Ji L, Chevalier D, Agarwal M, Ramachandran V, Li W, Lagrange T, Walker JC et al. (2008) The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proceedings of National Academy of Science of U S A* 105: 10073–10078.
228. Yu H, Chen X, Hong YY, Wang Y, Xu P, Ke SD, Liu HY, Zhu JK, Oliver DJ, Xiang CB (2008) Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers
-

- drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *The Plant Cell* 20: 1134–1151.
229. Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experiment Botany* 60: 3781–3796.
230. Zhang, X, Zou, Z, Gong, P, Zhang, J, Ziaf, K, Li, H, Xiao, F and Ye, Z (2011) Overexpression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters* 33: 403-409.
231. Zhang Z, Wei L, Zou X, Tao Y, Liu Z, Zheng, Y (2008) Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Annals of Botany* 102: 509-519.
232. Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 585-590.
233. Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y (2009) Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Molecular Biology* 10: 29.
234. Zhao C, Avci U, Grant EH, Haigler CH, Beers EP (2008) XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *The Plant Journal* 53: 425-436.
235. Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y, et al. (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Molecular Biology* 55: 807-823.
236. Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 985-989.

-
237. Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, DUan M, Luo L(2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 61: 4157-4168.
238. Zhou, X, Wang, G and Zhang, W (2007) UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 3: 103.
239. Zhou X, Wang G, Sutoh K, Zhu JK, Zhang W (2008) Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779:780-788.
240. Zhu C, Ding Y, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum* 143: 1-9
241. Zhu J, Verslues PE, Zheng X, Lee BH, Zhan X, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu Y, Dong C-H, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (2005) HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 102: 9966–9971.
242. Zhu, JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Живко Јовановић

број индекса ИО070001

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

„Улога транскрипционог фактора DREB2A и малих РНК miR398a/b и miR408 у одговору грашка (*Pisum sativum* L.) на дехидратацију”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 26.08.2013.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Живко Јовановић

Број индекса ИО070001

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Улога транскрипционог фактора DREB2A и малих РНК miR398a/b и miR408 у одговору грашка (Pisum sativum L.) на дехидратацију”

Ментор проф.др Светлана Радовић

Потписани/а Живко Јовановић

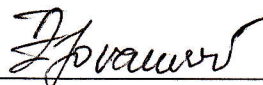
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога транскрипционог фактора DREB2A и малих РНК miR398a/b и miR408 у одговору грашка (*Pisum sativum* L.) на дехидратацију

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

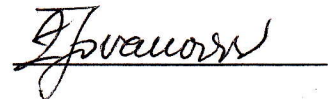
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2013.



BIOGRAFIJA

Živko Jovanović je rođen 22.01.1983. god. u Valjevu, gde je završio Valjevsku gimnaziju. Studije Molekularne biologije i fiziologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je 2002., a diplomirao je 2007. na smeru Genetičko inženjerstvo i biotehnologija kao student generacije, sa prosečnom ocenom 9,77. Od 2007. Zaposlen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Učestvovao je na jednom međunarodnom projektu, na tri nacionalna projekta i četiri bilateralna projekta. Član je Društva biljnih fiziologa Srbije, Federation of European Societies of Plant Biology, Legume Society, Srpskog biohemijskog društva i Federaton of Europan Biochemical Societies. Govori engleski i francuski jezik.

Do sada je objavio 23 kongresna sopštenja i ima 15 objavljenih radova, od toga iz doktorske disertacije ima objavljen sledeći rad:

1. **Jovanović, Ž.**, Stanisavljević, N., Mikić, A., Radović, S., maksimović, V. (2013): The expression of drought responsive element binding protein (DREB2A) related gene from pea (*Pisum sativum* L.) as affected by water stress. Australian Journal of Crop Science 7, 1590-1596.