UDZIAŁ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH I MECHANIZMÓW EPIGENETYCZNYCH W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES SUSZY

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTORS AND EPIGENETIC MECHANISMS IN PLANTS DROUGHT STRESS RESPONSE

Katarzyna LECHOWSKA, Łukasz WOJTYLA,
Szymon KUBALA, Małgorzata GARNCZARSKA

Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Streszczenie: Rośliny są nieustannie narażone na działanie różnych abiotycznych czynników stresowych. Susza jest jednym z głównych czynników środowiskowych negatywnie wpływających na procesy życiowe roślin, stąd też rośliny wykształciły szereg złożonych mechanizmów obronnych pozwalających na przeciwdziałanie negatywnym skutkom stresu. Tolerancja na stres suszy jest wynikiem zmian pojawiających się na wszystkich poziomach organizacji rośliny – molekularnym, fizjologicznym, komórkowym, tkankowym oraz całego organizmu. Jedną z kluczowych reakcji roślin na deficyt wody jest zmiana profilu ekspresji genów, w tym genów odpowiedzi na stres oraz akumulacja ich produktów białkowych, co w konsekwencji umożliwia roślinom przystosowanie się do niekorzystnych warunków wodnych w środowisku. Regulacja ekspresji informacji genetycznej podczas stresu suszy odbywa się m.in. za pomocą czynników transkrypcyjnych z rodzin: bZIP, AP2/EREBP, NAC, MYB/MYC, NF-Y, ZF-HD, ZFP oraz WRKY. Coraz większa liczba danych pojawiających się w ostatnich latach wskazuje, że istotnym elementem w kontroli ekspresji genów podczas ekspozycji na stres suszy są również modyfikacje epigenetyczne, takie jak: metylacja nici DNA, modyfikacje histonów oraz wyciszanie genów przez mikro RNA. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat kontroli ekspresji genów za pomocą czynników transkrypcyjnych oraz mechanizmów epigenetycznych jako molekularnych podstaw tolerancji roślin na stres suszy.

Słowa kluczowe: stres suszy, czynniki transkrypcyjne, epigenetyka, tolerancja na stres suszy, mikro RNA

Summary: Plants are incessantly exposed to a wide range of abiotic stress factors. Drought is one of the major environmental stress agents, which negatively affects the growth and development of plants. Plants evolved a variety of protective mechanisms leading to stress resistance. Tolerance of drought stress is due to plant response at the molecular, physiological, cellular, tissue, and whole organism levels. One of the pivotal plant responses to water deficit is alteration in genes expression profile,

including stress response genes and accumulation of their protein products, which enables plants to adapt to drought. Regulation of gene expression under drought stress includes activity of transcription factors belonging to bZIP, AP2/EREBP, NAC, MYB/MYC, NF-Y, ZF-HD, ZFP and WRKY families. Results, published in recent years, demonstrate the significance of mechanisms of the genes expression regulation under drought stress, such as epigenetic modifications including DNA methylation, histones modifications, and genes silencing by micro RNAs. The aim of this paper is to overview the current state of knowledge of regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by transcription factors as well as epigenetic mechanisms as the molecular basis of plant tolerance to drought stress.

Key words: drought stress, transcription factors, epigenetic, drought stress tolerance, micro RNA

WSTĘP

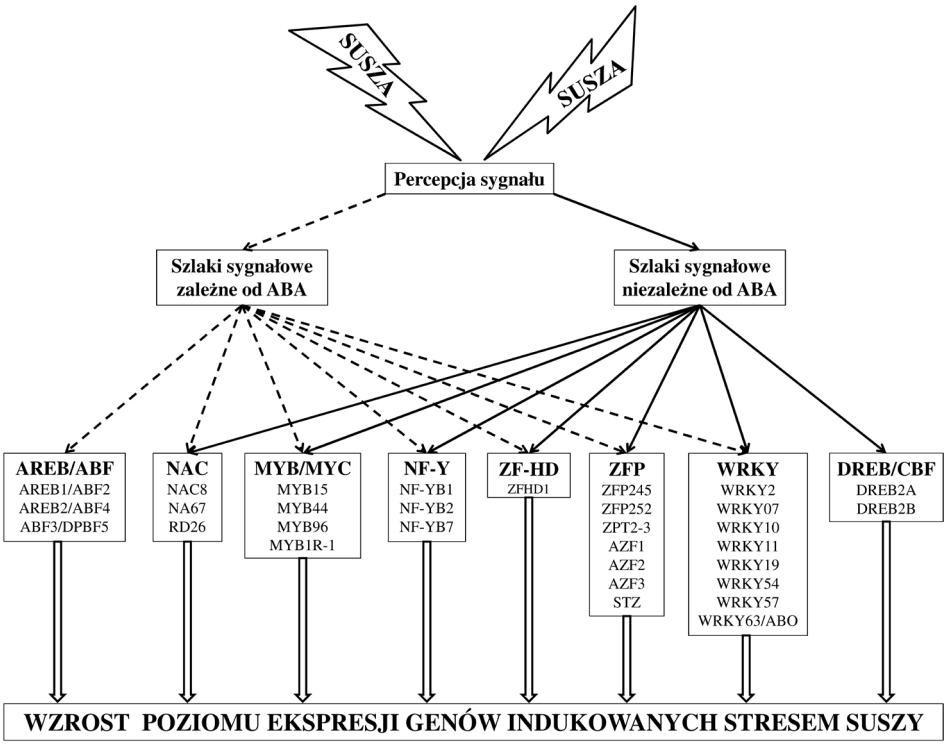
Monitoring globalnych zmian klimatycznych w ostatnich dziesięcioleciach wskazuje na niepokojący trend nasilania się ekstremalnych zjawisk pogodowych, w tym pojawianie się coraz częstszych i bardziej intensywnych okresów posusznych. Stanowi to poważany problem zarówno w ujęciu środowiskowym, społecznym jak i gospodarczym. Od lat 60-tych, obserwuje się sukcesywne zwiększanie zasięgu suszy na obszarach przeznaczonych pod uprawę roślin użytkowych, co wraz ze wzmożoną intensywnością oraz częstością występowania suszy prowadzi do istotnych strat w światowej produkcji rolnej [49].

Stres suszy definiowany jest jako zaburzenie wewnątrzkomórkowej równowagi stosunków wodnych na skutek przewagi utraty wody w wyniku transpiracji nad jej pobieraniem przez roślinę [82]. Deficyt wody prowadzi do szeregu niekorzystnych zmian w procesach fizjologicznych i biochemicznych rośliny. Niedobór wody skutkuje m.in. zahamowaniem wzrostu, zaburzeniami procesu fotosyntezy, kiełkowania nasion, homeostazy jonowej, a także przyczynia się do istotnego wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), powodujących uszkodzenia oksydacyjne komponentów komórkowych. Istotna wydaje się być zatem dogłębna znajomość konsekwencji działania stresu suszy na rośliny, a także wykształconych przez nie mechanizmów obronnych. Niniejszy artykuł stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego reakcji roślin na warunki suszy ze szczególnym uwzględnieniem roli czynników transkrypcyjnych oraz modyfikacji epigenetycznych jako kluczowych elementów odpowiedzi roślin na bodźce środowiskowe.

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Percepcja stresu prowadzi do zainicjowania szeregu zależnych od siebie reakcji, które prowadzą do uruchomienia mechanizmów odpowiedzialnych za proces nabywania tolerancji przez rośliny. Aktywacja szlaków przekazywania sygnałów

odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska wpływa również na zmiany poziomu ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na stres. Jedną z grup genów, których poziom ekspresji ulega zmianie w wyniku ekspozycji na stres, są czynniki transkrypcyjne (TF). TF działają w układzie *trans* i poprzez wiązanie do elementów *cis* zlokalizowanych w promotorach genów regulują ich ekspresję [10]. Do rodzin czynników transkrypcyjnych aktywowanych w warunkach deficytu wody zalicza się m.in.: bZIP (np. AREB/ABF), AP2/EREBP (np. DREB/CBF), NAC, MYB/MYC, NF-Y, ZF-HD, ZFP oraz WRKY [10, 116]. Należy zauważyć, że część z nich działa w sposób zależny od kwasu abscysynowego (ABA), a część niezależnie (ryc. 1).



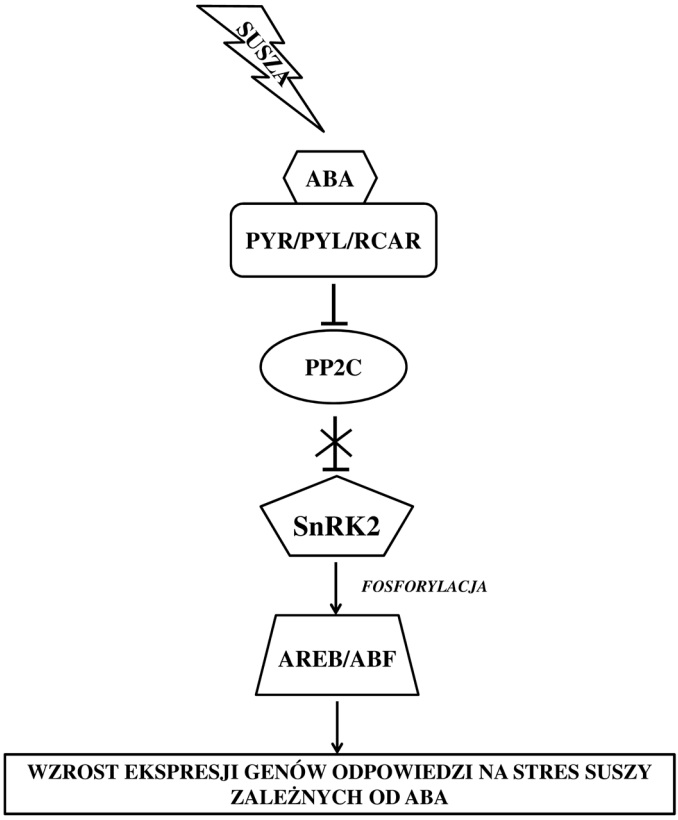
RYCINA 1. Czynniki transkrypcyjne uczestniczące w ABA-zależnej i ABA-niezależnej kontroli ekspresji genów w odpowiedzi na stres suszy. Schemat przedstawia najważniejsze rodziny i podrodziny czynników transkrypcyjnych oraz przykłady ich przedstawicieli biorących udział w mechanizmach zwiększających tolerancję roślin na stres suszy. Przerywane linie oznaczają szlaki zależne od ABA. Linie ciągłe oznaczają szlaki niezależne od ABA

FIGURE 1. The transcription factors that regulate the level and activity of *drought-responsive* genes in an ABA-*dependent* and an ABA-independent manner. The diagram shows the most important families and subfamilies of transcription factors as well as examples of their members participating in plants tolerance to drought stress. Dashed lines indicate ABA-dependent *signaling* pathways. Solid lines represent ABA-independent *signaling* pathways

ABA reguluje wiele ważnych procesów w roślinach, włączając w to stan spoczynku i kiełkowanie nasion, zamykanie aparatów szparkowych, a także adaptację do stresu niedoboru wody [118]. Wykazano, że zależnie od ABA funkcjonują białka AREB/ABF, a niezależnie DREB. Wśród białek NAC, MYB/MYC, NF-Y oraz ZF-HD wyróżnia się podrodziny, które mogą ulegać aktywacji ABA-zależnej lub ABA-niezależnej (ryc.1). Dotyczy to również TF należących do tej samej podrodziny lecz uczestniczących w różnych szlakach sygnałowych [10, 46].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE AREB/ABF

Białka AREB lub inaczej ABF (ang. *ABA Responsive Element Binding proteins/ Factors*) należą do rodziny czynników transkrypcyjnych bZIP (ang. *basic leucine zipper*) zawierających w swej strukturze motyw zamka leucynowego. Czynniki te wiążą się do zachowawczego elementu *cis* – ABRE (ang. *ABA-Responsive Element*) znajdującego się w promotorach genów indukowanych przez ABA [46, 115, 117]. Sugeruje się, że przynajmniej część AREB/ABF ulega aktywacji w wyniku zależnej od ABA fosforylacji przez kinazy SnRK2 [101]. Proponowany model szlaku AREB/ ABF – SnRK2 w odpowiedzi na wzrost stężenia ABA podczas dehydratacji komórek wygląda następująco: cząsteczki ABA przyłączają się do kompleksu receptorowego PYR/PYL/RCAR (ang. *Pyrabactin Resistance1/PYR1-Like/Regulatory Components of ABA Receptor*). Związanie się ABA do PYR/PYL/RCAR powoduje hamowanie aktywności fosfataz PP2C (ang. *Protein Phosphatases 2C*) z grupy A, będących negatywnymi regulatorami aktywności kinaz SnRK2. W obecności ABA dochodzi do wzrostu aktywności SnRK2 fosforylujących AREB/ABF, co prowadzi do ekspresji genów odpowiedzi na ABA [26] (ryc. 2). W tkankach wegetatywnych *Arabidopsis* zaobserwowano wzrost ekspresji trzech członków podrodziny AREB/ ABF (AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF3/DPBF5) indukowany przez ABA, suszę oraz zasolenie [24]. W badaniach tych wykazano, że podczas niedoboru wody AREB1 aktywuje ekspresję kilku genów uczestniczących w redukcji negatywnego wpływu suszy: *HIS1-3* – kodującego histon linkerowy H1-S, który potencjalnie uczestniczy w rearanżacji chromatyny w warunkach stresu, *AIA1* kodującego AAA ATPazę o aktywności opiekuńczej oraz genów kodujących kilka klas białek LEA (ang. *Late Embryogenesis Abundant*). Stwierdzono, iż podczas suszy regulacja AREB1 przez ABA, odmiennie niż w przypadku AREB2/ABF4, ABF3/DPBF5, może zachodzić zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i w wyniku fosforylacji przez kinazy SnRK2 [24, 25]. Niedawne badania wykazały, że nadekspresja *AhAREB1* u *Arabidopsis* prowadzi do aktywacji genów zaangażowanych w usuwanie ROS (*CAT2, CCS, SOD1* i *CSD3*), a także utrzymania wysokiej aktywności CAT i SOD zarówno w warunkach kontrolnych jak i podczas suszy [48]. Nadekspresja *ABF3* oraz *ABF4* w liniach transgenicznych *Arabidopsis* spowodowała obniżenie



RYCINA 2. Proponowany model szlaku AREB/ABF – SnRK2 regulującego transkrypcję genów w odpowiedzi roślin na stres suszy. Przyłączenie ABA do receptora PYR/PYL/RCAR prowadzi do unieczynnienia fosfataz PP2C, stanowiących negatywne regulatory aktywności kinaz SnRK2. W obecności kwasu abscysynowego kinazy SnRK2 poprzez fosforylację aktywują czynniki transkrypcyjne AREB/ABF związane z regulacją ekspresji genów odpowiedzi na stres. Na podstawie [25, 26], zmienione
FIGURE 2. Model of the AREB/ABF-SnRK2 pathway that regulates ABRE-mediated transcription under drought stress in plants. In response to drought stress, ABA repress the activity of phosphatases PP2C. ABA interactions with PYR/PYL/RCAR receptor allows binding phosphatases PP2C and inhibition of their activity. PP2Cs impede the activity of protein kinases SNRK2 which are positive regulators of AREB transcription factors. In the presence of ABA, SnRK2s released from PP2C-mediated negative regulation phosphorylate AREB/ABFs, which then activate the expression of many stress-responsive genes. Based on [25, 26], modified

transpiracji oraz poprawę tolerancji odwodnienia [36]. Podobnie, rośliny z nadekspresją *ABF2* charakteryzowały się wyższą tolerancją na niedobór wody, a białko o ABF2 okazało się kluczowym komponentem szlaków sygnałowych glukozy [42]. Yoshida i wsp. [118] wykazali, że AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 oraz ABF3 mogą tworzyć w jądrze komórkowym homo- i heterodimery oraz, że ich funkcje w dużej

mierze się pokrywają. Potrójne mutanty (jednoczesny nokaut genów *areb1*, *areb2*, *abf3*) cechowały się zmniejszoną wrażliwością na ABA oraz spadkiem tolerancji na suszę w porównaniu z mutantami pojedynczymi lub podwójnymi. Ponadto analiza transkryptomiczna potrójnych mutantów pozwoliła na zidentyfikowanie genów ulegających ekspresji w wyniku aktywacji AREB/ABF pod wpływem suszy, do których należą m.in. geny kodujące czynniki transkrypcyjne (np. *AtMYB102*), molekuły sygnałowe (np. *MAPKKK18*) oraz białka PP2C. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowano, że AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 oraz ABF3 działają w sposób kooperatywny i są istotnym elementem regulacji genów indukowanych przez ABA podczas suszy [118].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE DREB/CBF

Białka DREB/CBF (ang. *Dehydration Responsive Element Binding/C-repeat-Binding Factor*) regulują odpowiedź roślin na stresy abiotyczne w sposób niezależny od ABA [46]. Należą one do rodziny czynników transkrypcyjnych AP2/ERF (APETALA2/*Ethylene Responsive-element binding Factor*), zawierających pojedynczą domenę wiążącą DNA. DREB/CBF rozpoznają sekwencję DRE, która po raz pierwszy została zidentyfikowana w promotorze genu *rd29A* indukowanego suszą oraz wysokim zasoleniem [114]. Białka podrodziny DREB dzielą się na sześć mniejszych grup (od A1 do A6), spośród których dwie grupy: A1 i A2 są najliczniejsze. W warunkach suszy, tak samo jak w przypadku szoku cieplnego, akumulowane są głównie białka DREB2 należące do grupy A2 [2]. U *Arabidopsis*, spośród 8 przedstawicieli grupy DREB2, białka DREB2A i DREB2B są najsilniej indukowane przez suszę oraz zasolenie i stanowią główne czynniki transkrypcyjne funkcjonujące w tych warunkach [65, 84]. Do aktywacji genów regulowanych przez białko DREB2A wymagany jest nie tylko wzrost ilości transkryptów *AtDREB2A*, ale również modyfikacje potranslacyjne (prawdopodobnie fosforylacja) [54, 85]. DREB2A posiada na C-końcu domenę NRD (ang. *Negative Regulatory Domain*), której usunięcie powoduje przejście w formę aktywną DREB2A-CA [85]. Nadekspresja *AtDREB2A-CA* oraz jego ortologa *GmDREB2A;2* u *Arabidopsis* spowodowała znaczący wzrost tolerancji na stres suszy [63, 85].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE NAC

Rodzina czynników transkrypcyjnych NAC jest charakterystyczna dla roślin i stanowi jedną z największych rodzin wśród roślinnych czynników transkrypcyjnych [73]. Białka NAC wiążą się z elementami *cis* (NACR) w promotorach regulowanych genów za pomocą domeny NAC zlokalizowanej po stronie N-końcowej

łańcucha polipeptydowego [50]. W warunkach stresowych geny NAC mogą pośredniczyć w szlakach sygnałowych zależnych jak i niezależnych od ABA, co jest związane z obecnością w ich promotorach różnych elementów *cis* [73]. Wykazano, że w odpowiedź niezależną od ABA na różne stresy, w tym na stres suszy, zaangażowane są m.in. TaNAC8 u *Triticum aestivum* [109] oraz SiNAC u *Setaria italica* [72]. Zależnie od ABA funkcjonuje białko RD26 zidentyfikowane u *Arabidopsis*. Wzrost ekspresji genu *RD26* był indukowany przez deficyt wody, wysokie zasolenie oraz traktowanie ABA i kwasem jasmonowym. Nadekspresja *RD26* skutkowała nadmierną wrażliwością roślin na ABA. Wykazano również, że w regionie promotorowym tego genu znajdują się m.in. elementy ABRE, MYC i MYB, regulujące ekspresję *RD26* zależnie od ABA. W warunkach stresowych RD26 stanowił aktywator ekspresji wielu genów, w tym genu *GLY* zaangażowanego w mechanizmy antyoksydacyjne i genu *RD20* związanego z transdukcją sygnału [23]. Dalsze badania funkcji genu *RD26* podczas suszy wskazały, że wzrost jego ekspresji kontrolowany jest przez szlak sygnałowy ABA składający się z PYR/PYL/RCAR, PP2C oraz SnRK2 [22, 25]. Opublikowane dane świadczą również o kooperatywnym działaniu białek NAC z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w regulacji reakcji roślin na stres suszy [98]. U *Arabidopsis* gen indukowany suszą *ERD1* (ang. *Early Responsive to Dehydratation 1*) posiada w promotorze dwa elementy *cis* – NACRS oraz ZFHDRS rozpoznawane odpowiednio przez NAC i białko ZFHD1 z rodziny ZF-HD (ang. *Zinc Finger-Homeodomain proteins*). Ekspresja *ERD1* możliwa jest w wyniku równoczesnej aktywacji przez NAC i ZFHD1 [98]. Analiza morfologiczna transgenicznych siewek *Arabidopsis* z nadekspresją genu pochodzącego z *T. aestivum TaNAC67* w warunkach umiarkowanej suszy wykazała, że rośliny te miały wyższą zdolność do zatrzymywania wody w tkankach oraz zwiększoną stabilność błon komórkowych. Dodatkowo wykazano, że nadekspresja *TaNAC67* u *Arabidopsis* prowadziła do wzrostu ekspresji genów odpowiedzialnych za podwyższoną tolerancję na abiotyczne czynniki stresowe (*DREB2A*, *COR15*, *ABI1* oraz *ABI2*) [57].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE MYB/MYC

Rodzina czynników transkrypcyjnych MYB/MYC pełni rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych w roślinach, zarówno w warunkach optymalnych jak i podczas stresu. Na podstawie liczby powtórzeń w domenie wiążącej DNA, czynniki transkrypcyjne MYB skategoryzowano w 3 podrodziny: 1) R2R3-MYB z dwoma sąsiadującymi powtórzeniami aminokwasów (R2R3), 2) R1R2R3-MYB (3 powtórzenia – R1R2R3) oraz 3) białka podobne do MYB zwykle zawierające pojedyncze powtórzenie (R1) [92]. Wśród tych trzech grup najszerzej rozpowszechniona u roślin jest podrodzina R2R3-MYB.

Wykazano, że u *Arabidopsis* czynnik transkrypcyjny MYB96, należący do R2R3-MYB, pośredniczy w zależnej od ABA indukcji genu *RD22* prowadząc do zamykania aparatów szparkowych i wzrostu odporności na suszę [88]. W warunkach niedoboru wody MYB96 integruje sygnał ABA z sygnałem auksynowym hamując rozwój korzeni bocznych na etapie aktywacji merystemów [88]. Późniejsze badania udowodniły, że podczas suszy białko MYB96 odpowiedzialne jest również za wzrost ekspresji genów, których produkty białkowe zaangażowane są w biosyntezę wosków kutykularnych, co również stanowi element odporności roślin na stres suszy [87]. Nadekspresja *MYB44*, którego produkt białkowy jest przedstawicielem podrodziny R2R3-MYB, w transgenicznych liniach *Arabidopsis* spowodowała zamknięcie aparatów szparkowych i wzrost tolerancji na suszę, zasolenie oraz niską temperaturę. Ponadto nadekspresja *MYB44* skutkowała obniżeniem ekspresji genów kodujących białka PP2C stanowiących negatywne regulatory kaskady sygnałowej ABA [35]. Wzrost tolerancji na suszę i zasolenie wykazano również w odmianie transgenicznej *Aarabidopsis* charakteryzującej się nadekspresją *MYB15* [16]. Odmiana transgeniczna *Solanum tuberosum* z nadekspresją *StMYB1R-1* wykazywała zwiększoną tolerancję na stres suszy, co autorzy tłumaczą regulacją transpiracyjnej utraty wody przez StMYB1R-1. Badania te dowiodły, że StMYB1R-1 aktywuje ekspresję kilku genów podobnych do *AtHB-7*, *RD28*, *ALDH* oraz *ERD15* zaangażowanych w mechanizmy obronne podczas niedoboru wody oraz innych stresów abiotycznych [89].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE ZFP

Jednym z lepiej scharakteryzowanych motywów wiążących DNA w czynnikach transkrypcyjnych jest palec cynkowy (ZF) typu Cys2/His2 (C2H2). Motyw ten obecny jest w białkach TFIIIA (białka z domeną palca cynkowego C2H2, ang. *C2H2-Type zinc Finger proteins*), które u roślin zaangażowane są zarówno w procesy rozwojowe jak i w regulację odpowiedzi na stresy abiotyczne [12]. U *Oryza sativa*, spośród 189 zidentyfikowanych genów kodujących białka z rodziny TFIIIA, 26 ulega pozytywnej regulacji przez stres zasolenia, niskiej temperatury oraz suszy [1]. Do czynników transkrypcyjnych TFIIIA zwiększających tolerancję *O. sativa* na stres niedoboru wody należą białka ZFP252 [113] oraz ZFP245 [31]. Białko ZFP252 jest odpowiedzialne za aktywację genów związanych ze stresem. Jego nadekspresja w transgenicznej odmianie *O. sativa* spowodowała nagromadzenie białek LEA, a także substancji kompatybilnych takich jak prolina i rozpuszczalne cukry, prowadząc do wzrostu tolerancji na suszę oraz zasolenie. Tolerancja odwodnienia linii transgenicznej *O. sativa* z nadekspresją *ZFP252* była związana z indukcją genu *DREB1A*. Sugeruje się, że ZFP252 może być pozytywnym regulatorem *DREB1A* [113]. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy

(POD) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w odpowiedzi na niedobór wody oraz niską temperaturę odnotowano w siewkach *O. sativa* z nadekspresją ZFP245. Siewki te charakteryzowały się ponadto podwyższonym poziomem proliny na skutek wzrostu ekspresji genu syntazy pirolino-5-karboksylanu (*P5CS*), kodującego enzym szlaku syntezy proliny oraz genów kodujących transportery proliny [31]. Białka z domeną palca cynkowego zaangażowane w mechanizmy tolerancji roślin na stres suszy opisano także u *Petunia hybrida* (ZPT2-3) [93], oraz *Arabidopsis* (AZF1, AZF2, AZF3, STZ) [83].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE WRKY

Rodzina WRKY stanowi kolejną grupę czynników transkrypcyjnych mających istotne znaczenie w regulowaniu reakcji roślin na czynniki stresowe [100]. U *Arabidospis* nadekspresja *WRKY63/ABO3* [79] oraz *WRKY57* [34] spowodowała wzrost tolerancji na stres suszy w sposób zależny od ABA. Liczne dane wskazują, że nadekspresja genów kodujących białka należące do rodziny WRKY zwiększa tolerancję odwodnienia również u gatunków uprawnych. U *O. sativa* są to m.in. *OsWRKY07* [77], *OsWRKY11* [108], *OsWRKY45* [75], u *Nicotiana tabacum TaWRKY10* [104], a u *T. aestivum TaWRKY2* [68] oraz *TaWRKY19* [68]. Transformacja *Arabidopsis* genem *GmWRKY54* z *Glycine max* doprowadziła do wzrostu tolerancji na suszę i zasolenie, prawdopodobnie w wyniku regulacji przez WRKY54 czynników transkrypcyjnych DREB2A oraz STZ/Zat10 [125].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE NF-Y

Pojawiające się w ostatnich latach dane wskazują, że w szlakach regulujących odpowiedź roślin na stres suszy uczestniczą również czynniki transkrypcyjne z rodziny NF-Y (ang. *Nuclear Factor Y*) [29, 47, 67, 91]. Białka NF-Y stanowią heterotrimeryczne kompleksy zbudowane z trzech podjednostek: NF-YA, NF-YB, NF-YC. U zwierząt i grzybów poszczególne podjednostki kodowane są przez pojedynczy gen, podczas gdy u roślin zidentyfikowano wiele rodzin genów dla każdej z podjednostek [28]. Białka NF-Y wykazują silne powinowactwo do kasety CCAAT zlokalizowanej w promotorach i/lub wzmacniaczach wielu genów [14]. Wykazano, że AtNF-YB1, ZmNF-YB2 oraz TaNF-YB2 uczestniczą w indukowaniu mechanizmów związanych z odpornością na suszę odpowiednio u *Arabidopsis*, *Zea mays* i *T. aestivum*, a także przyczyniają się do zwiększenia produktywności upraw podczas stresu niedoboru wody [67, 91]. Nadekspresja *AtNF-YB1* spowodowała zwiększenie współczynnika przeżycia roślin transgenicznych w porównaniu z roślinami dzikimi. Mutanty charakteryzowały się zdolnością do utrzymywania

wyższego potencjału wody oraz wysokiej wydajności fotosyntezy [67]. Podobnie, zwiększona ekspresja *ZmNF-YB2* (ortologa *AtNF-YB1*) u *Z. mays* doprowadziła do wzrostu tolerancji na stres suszy poprzez zwiększenie intensywności fotosyntezy, zawartości chlorofilu, przewodności szparkowej oraz obniżenie temperatury liści [67]. U *Arabidopsis* nadekspresja podjednostki *PdNF-YB7* z *Populus* przyczyniła się do wzrostu tolerancji siewek na stres suszy, co m.in. przekładało się na ich fenotyp. Siewki transgeniczne charakteryzowały się zwiększoną powierzchnią liści oraz długością korzeni pierwotnych, wzrostem współczynnika fotosyntezy, a także polepszeniem współczynnika wykorzystania wody (WUE, ang. *Water Use Efficiency*) w warunkach niedoboru wody w porównaniu do roślin dzikich. Ekspozycja na stres niedoboru wody spowodowała u roślin transgenicznych aktywację kilku genów indukowanych suszą (*KIN1*, *LEA76*, *LTP*, *GST),* sugerując udział PdNF-YB7 w akumulacji białek opiekuńczych podczas suszy. Badania te wskazują również, że odmiennie niż w przypadku AtNF-YB1, PdNF-YB7 jest elementem szlaków sygnałowych ABA. Analiza sekwencji promotora *PdNF-YB7* wykazała, że w jego obrębie występuje kilka elementów *cis* związanych z odpowiedzią na ABA (ang. *ABA-Responsive Elements,* ABRE). Co więcej nadekspresja *PdNF-YB7* skutkowała zmianami w aktywności genów *RD29B* oraz *CBFY* wykorzystywanych jako markery szlaku ABA-zależnego [29].

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES SUSZY

Informacja o pojawieniu się czynnika stresowego jest odbierana przez komórki i przekazywana szlakami transdukcji sygnału do jądra, gdzie przy udziale specyficznych czynników transkrypcyjnych następuje aktywacja genów kodujących białka efektorowe, umożliwiające przystosowanie się rośliny do zmiennych warunków środowiskowych. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących na istotny udział mechanizmów epigenetycznych w odpowiedzi na stres, polegających na regulacji ekspresji genów bez zmian w sekwencji DNA [62, 74]. Większość modyfikacji epigenetycznych zostaje usunięta po ustąpieniu stresu, jednak część z nich może się utrzymywać i być przekazywana komórkom potomnym w podziałach mitotycznych oraz mejotycznych. Dziedziczenie zmian epigenetycznych indukowanych stresem pozwala na tworzenie tzw. epigenetycznej pamięci stresu (ang. *epigenetic stress memory*) i polepszenie zdolności do tolerowania stresu u roślin następnej generacji [126]. Wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy epigenetycznej kontroli genomu – metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz wyciszanie genów przez małe RNA (sRNA), w tym mikro RNA.

METYLACJA DNA

Metylacja DNA polega na przeniesieniu grupy metylowej z S-adenozylometioniny na cytozynę (rzadziej na adeninę) i kowalencyjne przyłączenie do węgla w pozycji 5', w wyniku czego powstaje 5-metylocytozyna (5mC). U roślin za metylację odpowiedzialne są metylotransferazy należące do trzech rodzin: metylotransferazy 1 (MET1), chromometylazy 3 (CMT3), oraz metylotrnasferazy DRM [21]. Metylacja powoduje zmniejszenie powinowactwa DNA do czynników transkrypcyjnych, prowadząc do przejścia genu w stan nieaktywny. [20]. U roślin, w odróżnieniu do zwierząt, metylacja zachodzi zarówno w regionach promotorowych jak i kodujących. Dane literaturowe wskazują, że metylacja w regionach kodujących nie zawsze związana jest z wyciszeniem genu, czego dowodem są badania, w których obserwowano wzrost poziomu ekspresji genów konstytutywnych (ang. *house-keeping*) uwarunkowany metylacją regionów kodujących [120].

Zmiany we wzorze metylacji DNA pod wpływem działania suszy udokumentowano u takich gatunków jak *Pisum sativum* [45], *Z. mays* [97], *O. sativa* [106], *Arabidopsis* [13], *S. lycopersicum* [27], *Populus* [76] oraz *Quercus ilex* [80]. W dwóch odmianach *Macrotyloma uniflorum* – wrażliwej (HPKC) oraz tolerancyjnej na stres suszy (HPK4) analiza sekwencji CCGG wykazała, iż pełna metylacja oraz hemimetylacja (metylacja tylko jednej nici DNA) była częściej obserwowana w genomie odmiany HPKC. Dodatkowo badania te dostarczyły informacji dotyczących metylacji fragmentu DNA wykazującego homologię do genu *cbf-1* z *Cucumis staivus*, kodującego czynniki transkrypcyjne zaangażowane w mechanizmy odporności na stres suszy. Metylacja tego fragmentu była obserwowana tylko w odmianie wrażliwej, czym autorzy pracy tłumaczą różnice w stopniu tolerancji odwodniania przez oba genotypy [5]. W pracy autorstwa Wang i wsp. [106] opisano zmiany we wzorze metylacji DNA u dwóch linii *O. sativa*, tolerancyjnej oraz wrażliwej na stres niedoboru wody. Całkowity poziom metylacji/demetylacji był zbliżony u obu linii, przy czym zaobserwowano duże zróżnicowanie pod względem miejsc metylowanych lub demetylowanych w warunkach suszy. Na tej postawie Wang i wsp. [106] wnioskują, że w warunkach suszy następuje ekspresja innych zestawów genów u odmian tolerancyjnej i wrażliwej na odwodnienie. Ponadto zmiany w poziomie metylacji indukowane suszą były specyficzne tkankowo i rozwojowo. Wyniki te wskazują, że modyfikacje epigenetyczne mogą być ważnym mechanizmem regulacyjnym w przystosowaniu się *O. sativa* do stresu suszy [106]. Inne badania dotyczące *O. sativa* wykazały wyższy poziom metylacji DNA u odmiany wrażliwej niż u tolerancyjnej podczas niedoboru wody. Dodatkowo część zmian w metylacji DNA wywołanych suszą okazała się stabilna i dziedziczona przez kolejne pokolenia [123]. Badania nad metabolizmem proliny w warunkach stresu osmotycznego

spowodowanego suszą wskazują, że jej akumulacja jest związana ze zmianami poziomu metylacji DNA genów kodujących enzymy szlaku syntezy proliny. W badaniach przeanalizowano wzory metylacji 3 genów ściśle związanych z biosyntezą proliny (*P5CS, P5CR* oraz *OAT*) i wykazano, że sekwencje dwóch z nich (*P5CR* oraz *OAT*) ulegają demetylacji w warunkach deficytu wody. Sugeruje to, że demetylacja DNA zwiększa akumulację proliny poprzez wzrost poziomu ekspresji genów *P5CR i OAT* w odpowiedzi na stres [119]. Z kolei hipermetylację w warunkach suszy odnotowano w korzeniach *P. sativum* [45]. Wzrost metylacji wysp CpG w pierwszym egzonie genu *Asr1* odpowiedzialnego za syntezę białka z rodziny LEA oraz jednoczesne usunięcie metylacji w sekwencjach symetrycznych CpNpN spowodowało zwiększenie ekspresji tego genu w liściach *S. lycopersicum* eksponowanych na stres suszy [27].

W ostatnim czasie scharakteryzowano gen kodujący glikozylazę DNA u *Hordeum vulgare* (*HvDME*) będącą homologiem enzymu DEME u *Arabidopsis*. Analiza ekspresji wykazała zróżnicowaną aktywność tego genu w warunkach suszy w siewkach dwóch odmian *H.vulgare* – wrażliwej oraz tolerancyjnej. Po 10-dniowej ekspozycji na stres suszy nastąpił 10-krotny wzrosty ekspresji genu *HvDME* w odmianie tolerancyjnej, a tylko 2-krotny we wrażliwej. Dodatkowo stopień metylacji DNA w regionach promotorowych oraz transkrybowanych genu *HvDME* różnił się w obu odmianach wskazując na epigenetyczną regulację *HvDME* w warunkach suszy [38].

MODYFIKACJE HISTONÓW

Innym sposobem epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest modyfikacja N-końcowego ogona histonów tworzących rdzeń nukleosomu. Trimetylacja reszty lizyny w pozycji czwartej histonu H3 (H3K4) oraz acetylacja lizyny 9 (H3K9) zwykle związane są z aktywacją ekspresji genów, natomiast dimetylacja Lys9 H3K9 oraz Lys27 H3K27 prowadzą do obniżenia transkrypcji [74].

Wykazano, że u *Arabidopsis* stres suszy indukował trimetylację lizyny 4 histonu H3 (H3K4) oraz acetylację lizyny w pozycji 9 (H3K9) w obrębie genów *RD29A, RD29B, RD20* i *RAP2.4* (związanych z odpowiedzią na stres niedoboru wody), co łączyło się ze wzrostem poziomu transkrypcji tych genów [41]. Wykorzystując immunoprecypitację chromatyny oraz technikę ChIP-seq (ang. *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*) ustalono wzory rozmieszczenia mono-, di- oraz tri-metylowanej Lys 4 histonu H3 (H3K4me1, H3K4me2 oraz H3K4me3) w genomie *Arabidopsis* podczas suszy oraz w warunkach niestresowych. Modyfikacje H3K4me2 oraz H3K4me1 były bardziej rozpowszechnione w genomie niż H3K4me3, ale w warunkach niedoboru wody wykazywały niewielkie zmiany poziomu w odróżnieniu od H3K4me3. Poziom trimetylowanego histonu H3K4me3 był wyraźnie skorelowany ze zmianami w ekspresji genów (spadek lub wzrost poziomu tran-

skryptu), podczas gdy H3K4me1 hamował transkrypcję, a w przypadku H3K4me2 nie obserwowano związku z poziomem ekspresji genów [102]. Dodatnią zależność pomiędzy poziomem modyfikacji H3K4me3, a zmianami ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy odnotowano również u *O. sativa* [127]. W wyniku trimetylacji H3K4 nastąpiła aktywacja genów związanych m.in. z metabolizmem proliny oraz szlakami transdukcji sygnału. W liściach *S. lycopersicum* stres wodny spowodował obniżenie poziomu trimetylacji H3K27 w obrębie genu *Asr1* (kodującego białko z rodziny LEA), natomiast nie odnotowano zmian w ilości trimetylownej lizyny 4 (H3K4me3) [27]. Istotnych informacji na temat relacji pomiędzy transdukcją sygnału, a zmianami epigenetycznymi w trakcie suszy dostarczyły badania Ndamukong i wsp. [66]. Autorzy wykazali zależność między 5-fosforanem fosfatydyloinozytolu (PtdIns5P) – elementem lipidowego szlaku transdukcji sygnału, a trimetylotransferazą H3K4 (ATX1) uczestniczącą w metylowaniu promotora genu WRKY70 u *Arabidopsis*. Podczas suszy obserwowano hamowanie aktywności ATX1 (spadł poziom H3K4me3 w obrębie WRKY70, i ekspresja), przy jednoczesnej akumulacji 5-fosforanu fosfatydyloinozytolu (PtdIns5P). Sugeruje się, że PtdIns5P obniża ilość H3K4me3 prawdopodobnie przez sekwestrację ATX1 w cytozolu. Dane literaturowe świadczą również o udziale ABA w kształtowaniu się modyfikacji epigenetycznych w warunkach suszy. Podczas niedoboru wody ABA reguluje ekspresję białek Polycomb odpowiedzialnych za metylację histonów i zagęszczanie chromatyny [39]. Wyniki innych badań na *Arabidopsis* sugerują, że deacetylaza histonów AtHD2C jest zaangażowana w zależną od ABA odpowiedź na stres suszy. Kwas abscysynowy hamuje ekspresję *AtHD2C,* przy czym nadekspresja tego genu w liniach transgenicznych spowodowała zwiększenie tolerancji na stres suszy i zasolenie (m.in. w wyniku wzrostu ekspresji genów *RD9B* i *RAB18* kodujących białka z rodziny LEA) [90].

Mikro RNA

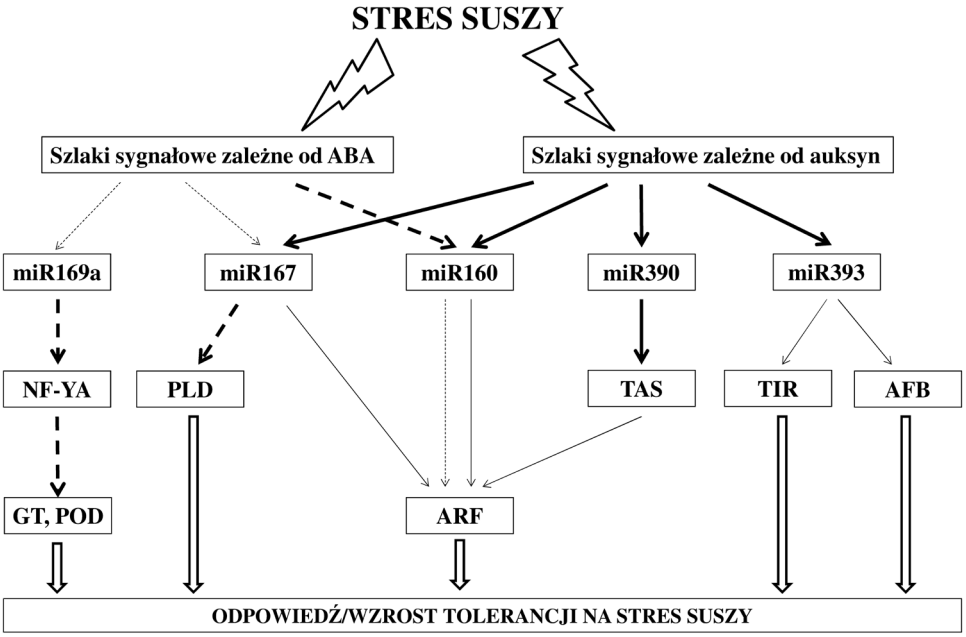
Mikro RNA (miRNA) to populacja niekodujących cząsteczek RNA, zwykle o długości ok. 21 nukleotydów. Ich funkcją jest regulacja ekspresji informacji genetycznej poprzez wyciszanie genów [61]. Mechanizm działania miRNA polega na degradacji mRNA w wyniku oddziaływania z kompleksem RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) zbudowanym z białek i miRNA (potranskrypcyjne wyciszanie genów) lub blokowania translacji przez wiązanie się kompleksu RISC do mRNA bez jego rozcinania (wyciszanie na poziomie translacji) [33].

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej danych sugerujących, że miRNA jest ważnym elementem modulującym odpowiedź roślin na stres suszy w ramach strategii tolerancji oraz unikania [15]. Głównym miejscem działania miRNA są cząsteczki mRNA czynników transkrypcyjnych, co świadczy o istotnym znaczeniu

miRNA w złożonej sieci regulacji ekspresji genów. Susza może indukować miRNA degradujące transkrypty białek zaangażowanych w odpowiedź na stres lub też obniżać ilość innych miRNA przyczyniając się do akumulacji cząsteczek mRNA, pozytywnie skorelowanych z adaptacją do stresu [15].

W dwóch genotypach *G. max* różniących się wrażliwością na niedobór wody wykazano znaczące różnice w profilu ekspresji miRNA podczas suszy [44]. Stres spowodował obniżenie ilości pięciu cząsteczek miRNA – miR166-5p, miR169f3p, miR1513c, miR397ab oraz miR-Seq13 w genotypie tolerancyjnym, natomiast w genotypie wrażliwym ich poziom uległ podwyższeniu. Podobną tendencję odnotowano dla miR-Seq11, którego docelowym mRNA jest transkrypt białka o aktywności peroksydazy zaangażowanej w usuwanie ROS. Poziom miR-Seq11 wzrósł istotnie w odmianie wrażliwej podczas suszy w porównaniu do roślin kontrolnych, natomiast w przypadku linii tolerancyjnej poziom miR-Seq11 był zbliżony w kontroli, jak i u roślin poddanych działaniu stresu, przy czym był on niższy niż w genotypie wrażliwym wystawionym na warunki stresowe. Przypuszcza się, iż niższa ekspresja miR-Seq11 u roślin odmiany tolerancyjnej podczas stresu stanowi jeden z czynników odpowiedzialnych za zmniejszoną podatność na suszę w porównaniu z odmianą wrażliwą [44]. Wyniki te sugerują również, że profil miRNA jest charakterystyczny dla danych genotypów wykazujących zróżnicowaną wrażliwość na stres, nawet wśród blisko spokrewnionych odmian [95].

Badania przeprowadzone przez Li i wsp. [47] wskazują na udział cząsteczek miRNA z rodziny miR169 w regulacji odpowiedzi na stres suszy u *Arabidopsis*. Niedobór wody, a także aplikacja egzogennego ABA spowodowały obniżenie ekspresji miR169a oraz miR169c, które wyciszają gen *NFYA5* kodujący jedną z podjednostek czynnika jądrowego Y (NF-Y) [47]. Autorzy sugerują, że głównie miR169a odpowiada za negatywną regulację ekspresji *NFYA5* podczas suszy. Ekspresja *NFYA5* w komórkach szparkowych powoduje obniżenie przewodności szparkowej w sposób zależny od ABA, natomiast w innych komórkach związana jest z aktywacją genów odpowiedzi na stres suszy, takich jak transferaza glutationu czy peroksydaza [47] (ryc. 3). Analiza funkcjonalna wskazała, że rośliny z usuniętym genem *nfya5* oraz rośliny charakteryzujące się nadekspresją *miR169a* wykazywały zwiększoną wrażliwość na stres suszy, podczas gdy nadekspresja *NFYA5* prowadziła do zwiększenia tolerancji na niedobór wody w wyniku ograniczenia transpiracji [47]. Obniżenie poziomu miR169 obserwowano również u *Medicago truncatula* w warunkach umiarkowanej suszy [105]. Z kolei badania przeprowadzone przez inny zespół nie wykazały zmian w poziomie miR169 w liściach roślin *M. truncatula* eksponowanych na silny stres suszy [98]. Przypuszcza się, że różnice w odpowiedzi miR169 na stres suszy u *M. truncatula* wynikają z zastosowania różnego natężenia stresu, a rodzina miR169 może być zaangażowana na wczesnych etapach odpowiedzi na stres [105]. Przeciwstawne wyniki w stosunku do *Arabidopsis* uzyskano dla siewek *S. lycopersicum*, u których podczas deficytu wody odnotowano



RYCINA 3. Udział cząsteczek miRNA w szlakach sygnałowych zależnych od ABA oraz auksyn prowadzących do wzrostu tolerancji roślin na stres suszy. Szczegóły w tekście. Line przerywane – szlaki sygnałowe zależne od ABA, linie ciągłe – szlaki sygnałowe zależne od auksyn. Pogrubione linie – indukcja, cienkie linie – inhibicja. Na podstawie [15], zmodyfikowane

FIGURE 3. Role of miRNAs in ABA-dependent and auxin signaling pathways leading to increased plants drought tolerance. Details in the text. Dashed line – ABA-dependent *signaling* pathways, solid lines – auxin signaling pathways. Bold lines – up-regulation, thin lines – down-regulation. Based on [15], modified

akumulację miR169 [121]. Susza spowodowała indukcję miR169c w powiązaniu z obniżeniem ilości mRNA *NF-YA1/2/3* oraz białka MPR1 należącego do rodziny transporterów MPR (ang. *Multidrug Resistance-associated Proteins*) [121]. Nadekspresja miR169c w linii transgenicznej *S. lycopersicum* spowodowała wzrost tolerancji odwodnienia w porównaniu do typu dzikiego. Nadekspresja miR169c korelowała ze spadkiem przewodności szparkowej oraz utraty wody przez transpirację w roślinach transgenicznych. Na tej podstawie sugeruje się, że miR169c zwiększa tolerancję siewek *S. lycopersicum* na stres niedoboru wody poprzez kontrolę ruchów komórek szparkowych [121]. Akumulację miR169g indukowaną przez suszę odnotowano u *O. sativa*, przy czym jego ekspresja była wyższa w korzeniach niż pędach [122]. W promotorze genu *MIR169g* występują dwa elementy DRE wskazując, że podlega on regulacji poprzez TF należące do podrodziny DREB [43]. Profil ekspresji miR169, może zależeć od stadium rozwojowego, warunków wzrostu, rodzaju badanych tkanek i organów, a także nasilenia i czasu trwania stresu [15].

Kolejnym przykładem miRNA związanego z odpowiedzią roślin na stres suszy poprzez kontrolę otwierania oraz zamykania aparatów szparkowych jest rodzina miR167 [107]. Postuluje się udział miR167 w regulacji puli transkryptów fosfolipazy D (PLD). Enzym ten uczestniczy w regulacji ruchów szparkowych i jest aktywowany przez ABA [18]. Nadekspresja *PLDα1* w *N. tabacum* spowodowała wzrost wrażliwości roślin na ABA oraz redukcję transpiracyjnej utraty wody na wczesnych etapach działania stresu suszy [30]. W siewkach *Z. mays* ekspozycja na deficyt wody hamowała ekspresję miR167 prowadząc do akumulacji transkryptów *PLD*. Autorzy wnioskują, że akumulacja mRNA genu *PLD* na skutek obniżenia ilości miR167, jest elementem odpowiedzi roślin na stres suszy zależnym od ABA [106] (ryc. 3).

Opublikowane do tej pory dane świadczą również o udziale kilku rodzin miRNA (miR160, miR167, miR390, miR393) w kontroli sygnału auksynowego podczas suszy [4, 7, 9, 19, 52, 53, 96, 117, 122] (ryc. 3). Wykazano, że auksyna stymuluje rozwój korzeni bocznych działając tym samym antagonistycznie do ABA, który prowadzi do hamowania rozwoju korzeni bocznych na rzecz korzenia głównego [8, 111]. Ograniczenie horyzontalnego rozwoju korzeni jest adaptacyjną odpowiedzią roślin na stres suszy umożliwiającą bardziej efektywny wzrost korzenia głównego i dotarcie do wody dostępnej w niższych warstwach gleby [111]. Susza indukuje akumulację miR393 u *Arabidopsis* [9, 96], *O. sativa* [121], *Saccharum* spp. [19]. Docelowe transkrypty rozpoznawane przez miR393 kodują dwa receptory auksyn TIR1 (ang. *Transport Inhibitor Response 1*) oraz AFB2 (ang. *Auxin signaling F-Box protein 2*), stanowiące pozytywne regulatory sygnału auksynowego [9]. W korzeniach *Arabidopsis* wykazano zależną od ABA destabilizację TIR1/AFB2 przez miR393 będącą mechanizmem adaptacyjnym do stresu suszy [9] (ryc. 3). Specyficzną genotypowo ekspresję 2 członków rodziny miR160 podczas suszy obserwowano u *Vigna unguiculata* [4]. Odmiana tolerancyjna charakteryzowała się akumulacją miR160a oraz miR160b degradujących białka ARF (czynniki transkrypcyjne zaangażowane w transdukcję sygnału auksynowego), natomiast u odmiany wrażliwej nie wykazano zmian w poziomie ich ekspresji podczas deficytu wody [4]. Ponadto, negatywną regulację ARF10 przez miR160 odnotowano w kiełkujących nasionach *Arabidopsis* wskazując na udział miR160 w krzyżowaniu się (ang. *cross-talk*) szlaków sygnałowych zależnych od auksyny oraz ABA [53] (ryc. 3). Zwiększenie ekspresji miR390 – kolejnej rodziny miRNA zaangażowanej w kontrolę sygnału auksynowego w trakcie ekspozycji na stres suszy odnotowano u *Brachypodium distachyon* [7] jak również u *V. unguiculata* [4]. Wykazano, że cząsteczki tej rodziny miRNA, poprzez cięcie niekodujących prekursorów RNA (TAS3), biorą udział w produkcji ta-siRNA, które z kolei hamują ekspresję *AFR4* (ryc. 3). Aktywacja miR390 w korzeniach *Arabidopsis* miała negatywny wpływ na formowanie korzeni bocznych [117]. Indukcja miR390 u *B. distachyon* i *V. unguiculata* w warunkach niedoboru wody może sugerować udział zachowawczego wśród roślin szlaku miR-390-TAS3-ARF4 w odpowiedzi na stres suszy [15].

Sugeruje się, że na architekturę korzeni mają również wpływ cząsteczki miRNA z rodziny miR166 regulujące poziom czynników transkrypcyjnych HD-Zip III odpowiedzialnych m.in. za tworzenie się korzeni bocznych u *M. truncatula* [6]. Linie z nadekspresją miR166a charakteryzowały się zredukowaną liczbą korzeni bocznych i brodawek symbiotycznych [6]. Wzmożoną ekspresję miR166 w korzeniach *M. truncatula* obserwowano w odpowiedzi na stres suszy, co może świadczyć o zaangażowaniu miR166 w rozwój korzeni podczas deficytu wody [99].

Wzrost tolerancji na stres suszy w wyniku nadekspresji miR369 odnotowano w transgenicznych liniach *Arabidopsis* [51] oraz *N. tabacum* [115]. miR369 jest zachowawczą rodziną miRNA wśród roślin jedno- i dwuliściennych, degradującą mRNA czynników transkrypcyjnych GRF (ang. *Growth-Regulating Factor*) odpowiedzialnych za rozwój liści [51]. Mutanty *Arabisopsis* z nadekspresją miR369a oraz miR369b traktowane stresem suszy posiadały obniżoną gęstość aparatów szparkowych oraz zredukowany indeks szparkowy, co ograniczało utratę wody, czym autorzy tłumaczą zwiększoną tolerancję na niedobór wody w porównaniu do roślin dzikich. Badania te sugerują również, iż miR369 może odgrywać istotną rolę w różnicowaniu się komórek liści podczas stresu suszy [51].

Zwiększenie tolerancji na stres suszy w wyniku regulacji metabolizmu proliny przez miRNA wykazano u siewek *Z. mays* [107]. Niedobór wody spowodował wzrost ilości cząsteczek z rodziny miR474, których docelowym mRNA jest transkrypt genu *PDH* kodującego dehydrogenazę proliny odpowiedzialną za jej degradację. Wzrost poziomu ekspresji miR474 w warunkach suszy związany był ze spadkiem ilości transkryptów *PDH* oraz z akumulacją wolnej proliny, stąd też sugeruje się, że indukcja ekspresji miR474 przyczynia się do uruchomienia mechanizmów osmoprotekcyjnych [107]. Pozytywną regulację miR474 w warunkach deficytu wody odnotowano również u *O. sativa* [124]. Autorzy wskazują, że docelowym mRNA dla miR474 są prawdopodobnie również transkrypty białek PPR (ang. *Pentatricopeptide Repeat Protein*), kinaz białkowych oraz kinezyn, co może świadczyć o zaangażowaniu miR474 w regulację ekspresji genów organelli komórkowych oraz potranskrypcyjną obróbkę RNA podczas stresu [124]. Wei i wsp. [107] wykazali, że regulacja ekspresji genów podczas suszy za pomocą miRNA może przyczyniać się do usprawnienia systemu antyoksydacyjnego. Akumulacja ABA podczas niedoboru wody prowadzi do nagromadzenia się H_2O_2 – reaktywnej formy tlenu, która jednocześnie jest molekułą sygnalną aktywującą MAP kinazy pośredniczące w indukcji ekspresji genów kodujących przeciwutleniacze. Stres suszy w siewkach *Z. mays* spowodował obniżenie ekspresji miR168 oraz pozytywną regulację ilości docelowych dla miR168 transkryptów MAP kinaz. Ekspozycja na stres zmniejszyła również poziom rodziny miR528 rozcinających mRNA peroksydazay (POD) [107]. Specyficzną odpowiedź dla liści w postaci hamowania ekspresji miR528 obserwowano również u *Triticum turgidum ssp. dicoccoides* po 8 godzinach stresu suszy [37]. Innym przykładem miRNA zaangażowanego w usuwanie

ROS jest rodzina miR398. Docelowymi transkryptami dla nich są m.in. mRNA dwóch blisko spokrewnionych miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych – cytozolowej CSD1 oraz plastydowej CSD2. Inhibicję ekspresji miR398 podczas suszy odnotowano u *M. truncatula* [105] oraz w korzeniach *Prunus persica* [17]. Ponadto w transgenicznej linii *O. sativa* nadekspresja odpornej na miR398 formy CSD2 spowodowała zwiększenie tolerancji na stres wodny oraz wysokie zasolenie w porównaniu z roślinami typu dzikiego [56]. Badania te sugerują, iż regulacja ekspresji genów przez miRNA może być ważnym elementem mechanizmów tolerancji na stres oksydacyjny generowany suszą.

Przykładem wykorzystania narzędzi inżynierii genetycznej w celu uzyskania nowych odmian roślin o wysokim stopniu tolerancji na stres suszy są badania Pieczyńskiego i wsp. [71]. Wykazano w nich wzrost tolerancji na stres suszy transgenicznej linii *S. tuberosum* charakteryzującej się wyciszeniem genu *CBP80* poprzez zastosowanie sztucznego miRNA. Białko CBP80 stanowi dużą podjednostkę jądrowego *kompleksu wiążącego kap* – CBC (ang. *Cap-Binding Complex*) biorącego udział m.in. w dojrzewaniu miR159. Wyciszenie genu *CBP80* skutkowało obniżeniem poziomu miR159 w warunkach deficytu wody, z jednoczesnym wzrostem ilości mRNA *MYB33* oraz *MYB101,* opisanych jako docelowe transkrypty dla miR159 oraz pozytywne regulatory ABA-zależnych szlaków sygnałowych.

BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W REAKCJE ROŚLIN NA STRES SUSZY

W większości przypadków zmiana poziomu ekspresji genów ma odzwierciedlenie w analogicznej zmianie poziomu akumulacji białek. Białka, których poziom wzrasta w odpowiedzi na działanie czynnika stresowego uczestniczą w procesie kształtowania tolerancji na warunki stresowe w różny sposób. Deficyt wody prowadzi ponadto do zaburzeń w konformacji oraz prawidłowym funkcjonowaniu białek. W wyniku ekspozycji na stres suszy dochodzi do odwodnienia komórek, zmniejszenia ich objętości oraz nagromadzenia ROS, co bezpośrednio wpływa na wzrost liczby białek podlegających denaturacji, degradacji/agregacji, czy też uszkodzeniom oksydacyjnym. Produkcja i akumulacja białek takich jak LEA, białka opiekuńcze, w tym HSP (ang. *Heat Shock Proteins*), USP (ang. *Universal Stress Proteins*), pełniących funkcje ochronne w stosunku do białek komórki, stanowi jeden z mechanizmów tolerancji umożliwiający roślinom przetrwanie suszy [32, 103].

Białka LEA akumulowane są w zarodkach nasion ulegających desykacji, jak również w odwodnionych tkankach wegetatywnych podczas działalna stresu suszy, zasolenia lub niskiej temperatury [116]. Dodatnią zależność pomiędzy gromadzeniem białek LEA, a tolerancją roślin na stres suszy wykazano m.in. u *Avena sativa*

[60], *Capsicum annuum* [40], *O. sativa* [110, 112] oraz *T. aestivum* [78]. Ze względu na występowanie zachowawczych motywów w sekwencji aminokwasów wyróżnia się 6 klas białek LEA, wśród których na szczególną uwagę zasługuje klasa II, do której należą dehydryny. Akumulacja dehydryn uważana jest za powszechną reakcję roślin na stres niedoboru wody [81], przy czym mechanizm działania dehydryn wciąż nie został szczegółowo opisany. Sugeruje się, że białka te stabilizują błony, wykazują aktywność chaperonów, a także hamują interakcje pomiędzy zdenaturowanymi białkami nie dopuszczając do formowania się agregatów [103]. Ze względu na wybitnie hydrofilowy charakter dehydryn postuluje się ich rolę w zapewnieniu wodnego środowiska na potrzeby podtrzymania aktywności enzymatycznej w silnie odwodnionych komórkach [70].

Stres suszy powoduje również akumulację białek opiekuńczych, do których należą białka szoku cieplnego HSP [102]. Wzrost tolerancji roślin na suszę w wyniku nadekspresji genów kodujących poszczególnych przedstawicieli HSP odnotowano m.in. u *N. tabacum* (nadekspresja genów kodujących białka BiP oraz Hsp70) [3, 11], *Arabidpsis* (nadekspresja *Hsp17.6A*) [94], w siewkach *O. sativa* (nadekspresja *sHsp17.7*) [86] oraz u *Gossypium hirsutum* (nadekspresja *GHSP26*) [58].

Białka USP po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w komórkach bakterii. Wykazano, że indukcja ekspresji genów kodujących USP zachodzi podczas ekspozycji bakterii na różnorodne czynniki stresowe [64, 69]. Homologi bakteryjnych białek USP obficie występują u roślin, jednak ich rola nie została jeszcze w pełni poznana [55]. Opublikowane w ostatnich latach dane sugerują, iż białka USP uczestniczą w odpowiedzi roślin na stres suszy [32, 55, 59]. W pracy Loukehaich i wsp. [55] wykazano, że nadekspresja genu *SpUSP* w transgenicznej linii *Solanum pennellii* (*SpUSP* OE) prowadzi do wzrostu tolerancji na suszę. Ekspozycja linii *SpUSP* OE na niedobór wody oraz zasolenie spowodowała wzrost poziomu ABA, stąd sugeruje się, że *SpUSP* jest elementem szlaków sygnałowych ABA-zależnych. Ponadto nadekspresja *SpUSP* w warunkach suszy spowodowała wzrost ilości białek LHCB (ang. *Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding proteins*), co przyczyniło się do zamknięcia aparatów szparkowych, a także utrzymania w stanie nienaruszonym kompleksu antenowego PSII. Wykazano również, że *SpUSP* prowadzi do akumulacji osmoprotektantów oraz hamowania produkcji ROS.

PODSUMOWANIE

W wyniku zachodzących zmian klimatycznych susza staje się obecnie coraz większym problemem, zwłaszcza w kontekście wzrostu i plonowania roślin uprawnych. Z tego względu poznanie podstawowych mechanizmów tolerancji roślin na stres suszy powinno stanowić ważny obszar zainteresowań badawczych. W toku

ewolucji rośliny wykształciły skompilowaną sieć mechanizmów adaptacyjnych, zarówno na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym, pozwalających na przetrwanie niedoboru wody w środowisku. W koordynacji ekspresji genów odpowiedzi na stres suszy biorą udział różne czynniki transkrypcyjne, które regulują poziom transkryptu genów kodujących białka zaangażowane w reakcje na deficyt wody. W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w badaniach nad epigenetyczną kontrolą ekspresji genów związanych z odpowiedzią roślin na stres suszy, do której zalicza się zmiany we wzorze metylacji DNA, modyfikacje histonów i rearanżację chromatyny, a także wyciszanie genów za pomocą mikro RNA. Modyfikacje epigenetyczne w znaczącym stopniu przyczyniają się do zmian w poziomie ekspresji genów w warunkach stresowych, tym samym wpływając na potencjał adaptacyjny. Pomimo zwiększającej się liczby prac poświęconych zagadnieniom reakcji roślin na odwodnienie, wciąż nie jest znany pełen obraz zdarzeń prowadzących do nabywania przez rośliny tolerancji na stres suszy. Konieczne są więc dalsze badania, nie tylko ze względów poznawczych, ale również ze względu na potencjalne wykorzystanie zdobytej wiedzy w inżynierii genetycznej i zwiększeniu tolerancji roślin użytkowych na deficyt wody.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w trakcie realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2011/03/B/NZ/00068

LITERATURA

[1] Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh AK, Singh VP, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi AK. Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol Biol* 2007; **65**:467-485.

[2] Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, Jaiswal JP, Qureshi MI, Singh NK. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J Genet* 2012; **91**: 385-95.

[3] Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. Plant Physiol 2001; **126**: 1042-1054.

[4] Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu ZG, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu JK, Liu R. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology* 2011; **11**: 127.

[5] Bhardwaj J, Mahajan M, Yadav SK. Comparative Analysis of DNA Methylation Polymorphism in Drought Sensitive (HPKC2) and Tolerant (HPK4) Genotypes of Horse Gram (Macrotyloma uniflorum). *Biochem Genet* 2013; **51**: 493-502.

[6] Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, Laffont C, Plet J, Combier JP, Niebel A, Crespi M, Frugier F. MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 2008; **54**: 876-887.

[7] Budak H, Akpinar A. Dehydration stress-responsive miRNA in *Brachypodium distachyon*: evident by genome-wide screening of microRNAs expression. *OMICS* 2011; 15: 791-799.

[8] Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 165-171.
[9] Chen H, Li Z, Xiong L. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *FEBS Lett* 2012; **586**: 1742 – 1747.
[10] Chen L, Wen-Binb L, Xin-An Z. Regulatory Network of Transcription Factors in Response to Drought in Arabidopsis and Crops. *Journal of Northeast Agricultural University* 2012; **19**:1-13.
[11] Cho EK, Hong CB. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 2006; **25**: 349 –358.
[12] Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1150-1160.
[13] Colaneri AC, Jones AM. Genome-wide quantitative identification of DNA differentially methylated sites in Arabidopsis seedlings growing at different water potential. *PLoS One* 2013; **8**: e59878.
[14] De Silvio A, Imbriano C, Mantovani R. Dissection of the NF-Y transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2578-2584.
[15] Ding Y, Tao Y, Zhu C. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *J Exp Bot* 2013; 64: 3077-3086.
[16] Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D. Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Genet Genomics* 2009; **36**:17-29.
[17] Eldem V, Akcay CU, Ozhuner E, Bakir Y, Uranbey S, Unver T. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PLoS One* 2012; **7**: e50298.
[18] Fan LM, Zhao Z, Assmann SM. Guard cells: A dynamic signaling model. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 537-546.
[19] Ferreira TH, Gentile A, Vilela RD, Costa GG, Dias LI, Endres L, Menossi M. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). *PLoS One* 2012; **7**: e46703.
[20] Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 223-247.
[21] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 2000; **43**:189-201.
[22] Fujii H, Verslues PE, Zhu JK. *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 1717-1722.
[23] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* 2004; **39**:863-876.
[24] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 3470-3488.
[25] Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi -Shinozaki K. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 2123-2132.
[26] Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant* 2013; **147**:15-27.
[27] Gonzalez RM, Ricardi MM, Iusem ND. Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene. *BMC Plant Biol* 2011; **11**: 94.
[28] Gusmaroli G, Tonelli C, Mantovani R. Regulation of novel members of the *Arabidopsis thaliana* CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. *Gene* 2002; **283**: 41-48.
[29] Han X, Tang S, An Y, Zheng D-C, Xia X-L, Yin, W-L. Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2013; **64**: 4589-4601.
[30] Hong Y, Zheng S, Wang X. Dual functions of phospholipase Dα1 in plant response to drought. *Mol Plant* 2008; **1**: 262-269.

[31] Huang J, Sun Sj, Xu Dq Yang X, Bao Y-M, Wang Z-F, Tang H-J, Zhang H. Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **389**: 556-561.

[32] Isokpehi RD, Simmons SS, Cohly HH, Ekunwe SI, Begonia GB, Ayensu WK. Identification of drought -responsive universal stress proteins in viridiplantae. *Bioinform Biol Insights* 2011; **5**: 41-58.

[33] Iwakawa H, Tomari Y. Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants. *Molecular Cell* 2013; **52**: 591-601.

[34] Jiang Y, Liang G, Yu D. Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2012; **5**:1375-1388.

[35] Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **146**: 623-635.

[36] Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2002; **14**:343-357.

[37] Kantar M, Lucas SJ, Budak H. miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 2011; **233**: 471-484.

[38] Kapazoglou A, Drosou V, Argiriou A, Tsaftaris AS. The study of a barley epigenetic regulator, HvDME, in seed development and under drought. *BMC Plant Biol* 2013; **13**:172.

[39] Kapazoglou A, Tondelli A, Papaefthimiou D, Ampatzidou H, Francia E, Stanca MA, Bladenopoulos K, Tsaftaris AS. Epigenetic chromatin modifiers in barley: IV. The study of barley Polycomb group (PcG) genes during seed development and in response to external ABA. *BMC Plant Biol.* 2010; **10**: 73.

[40] Kim HS, Lee JH, Kim JJ, Kim CH, Jun SS, Hong YN. Molecular and functional characterization of *CaLEA6*, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene* 2005; **344**:115-123.

[41] Kim JM, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, Toyoda T, Kimura H, Shinozaki K, Seki M. Alterations of lysine modifications on histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**:1580-1588.

[42] Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* 2004; **40**: 75-87.

[43] Kruszka K, Pieczynski M, Windels D, Bielewicz D, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z, Vazquez F. Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *J Plant Physiol* 2012; **169**: 1664-1672.

[44] Kulcheski FR, De Oliveira LFV, Molina LG, Almerão MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GAG, Margis R. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 2011; **12**: 307.

[45] Labra M, Ghiani A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M, Bracale M. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biology* 2002; **4**: 694-699.

[46] Lata C, Yadav A, Prasad M. Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance. In Shanker A and Venkateswarlu B eds. Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives, 2011; 169-296.

[47] Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell* 2008; **20**: 2238-2251.

[48] Li X, Liu X, Yao Y Li YH, Liu S, He CY, Li JM, Lin YY, Li L. Overexpression of Arachis hypogaea AREB1 gene enhances drought tolerance by modulating ROS scavenging and maintaining endogenous ABA content. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; **14**: 12827-12842.

[49] Li YP, Ye, W, Wang M, Yan XD. Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts. *Clim Res* 2009; **39**: 31-46.

[50] Lip S, Kurowska M, Szarejko I. Rodzina czynników transkrypcyjnych NAC, a zwiększenie tolerancji na stres niedoboru wody u roślin. *Postępy Biochemii* 2013; **59**: 295-304.
[51] Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiol Plantarum* 2009; **136**: 223-236.
[52] Liu H, Tian X, Li Y, Wu CA, Zheng C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 2008; **14**: 836-843.
[53] Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 2007; **52**: 133-146.
[54] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**: 1391-1406.
[55] Loukehaich R, Wang T, Ouyang B, Ziaf K, Li H, Zhang J, Lu Y, Ye Z. SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *J Exp Bot* 2012; **63**: 5593-5606.
[56] Lu Y, Feng Z, Bian L, Xie H, Liang J. miR398 regulation in rice of the responses to abiotic and biotic stresses depends on CSD1 and CSD2 expression. *Funct Plant Biol* 2011; **38**: 44-53.
[57] Mao X, Chen S, Li A, Zhai CH, Jing R. Novel NAC. Transcription Factor TaNAC67 Confers Enhanced Multi-Abiotic Stress Tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2014; **9**: e84359.
[58] Maqbool A, Abbas W, Rao AQ, Irfan M, Zahur M, Bakhsh A, Riazuddin S, Husnain T. *Gossypium arboreum* GHSP26 enhances drought tolerance in *Gossypium hirsutum*. *Biotechnol Prog* 2010; **26**: 21-25.
[59] Maqbool A, Zahur M, Husnain T, Riazuddin S. GUSP1 and GUSP2, two drought-responsive genes in *Gossypium arboretum* have homology to universal stress proteins. *Plant Mol Biol Rep* 2009; **27**: 109-114.
[60] Maqbool B, Zhong H, El-Maghraby Y, Ahmad A, Chai B, Wang W, Sabzikar R, Sticklen B. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing *hva1*. *Theor Appl Genet* 2002; **105**: 201- 208.
[61] Meng Y, Shao C, Wang H, Chen M. The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiol* 2011; **157**: 1583-1595.
[62] Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 267-274.
[63] Mizoi J, Ohori T, Moriwaki T, Kidokoro S, Todaka D, Maruyama K, Kusakabe K, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. GmDREB2A;2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. *Plant Physiol* 2013; **161**: 346-361.
[64] Nachin L, Nannmark U, Nystrom T. Differential roles of the universal stress proteins of Escherichia coli in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* 2005; **187**: 6265-6272.
[65] Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinityresponsive gene expression. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 657-665.
[66] Ndamukong I, Jones DR, Lapko H, Divecha N, Avramova Z. Phosphatidylinositol 5-phosphate links dehydration stress to the activity of ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE factor ATX1. *PLoS One* 2010; **5**: e13396.
[67] Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolikowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits

confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:16450-16455.

[68] Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ, Zhang WK, Ma B, Lin Q, Zhang ZB, Zhang JS, Chen SY. Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* 2012; **35**:1156-1170.

[69] Nystrom T, Neidhardt FC. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1992, **6**: 3187-3198.

[70] Peng Y, Reyes JL, Wei H, Yang Y, Karlson D, Covarrubias AA, Krebsd SL, Fessehaiee A, Arora R. RcDhn5, a cold acclimation responsive dehydrin from Rhododendron catawbiense rescues enzyme activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants. *Physiol Plant* 2008; **134**: 583-597.

[71] Pieczyński M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzeslowska M, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnol J* 2013; **11**: 459-469.

[72] Puranik S, Bahadur RP, Srivastava PS, Prasad M. Molecular cloning and characterization of a membrane associated NAC family gene, SiNAC from foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Mol Biotech* 2011; **49**: 138-150.

[73] Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 369-381.

[74] Qiao W, Fan L. Epigenetics, a mode for plants to respond to abiotic stresses. *Front Biol* 2011; **6**: 477-481.

[75] Qiu YP, Yu DQ. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot* 2009; **65**: 35-47.

[76] Raj S, Brautigam K, Hamanishi ET, Wilkins O, Thomas BR, Schroeder W, Mansfield SD, Plant AL, Campbell MM. Clone history shapes *Populus* drought responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 12521-12526.

[77] Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 865-879.

[78] Reid JL, Walker-Simmons MK. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Physiol 1993; **102**: 125-131.

[79] Ren X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, Hong X, Zhu JK, Gong Z. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J* 2010; **63**: 417-429.

[80] Rico L, Ogaya R, Barbeta R, Penuelas J. Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biol* 2013; doi:10.1111/plb.12049 (w druku).

[81] Rorat T. Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett* 2006; **11**: 536-556.

[82] Sade B, Soylu S, Yetim E. Drought and oxidative stress. *Afr J Biotechnol* 2011; **10**: 11102-11109.

[83] Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* Cys2/ His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol* 2004; **136**: 2734-2746.

[84] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 998-1009.

[85] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 2006; **18**: 1292-1309.

[86] Sato Y, Yokoya S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep* 2008; **27**: 329-334.
[87] Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park MJ, Go YS, Park CM. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; **23**:1138-1152.
[88] Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park JY, Lee YN, Kim SG, Lee YH, Park, WJ, Park CM. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **151**: 275-289.
[89] Shin D, Moon SJ, Han S, Kim BG, Park SR, Lee SK,Yoon HJ, Lee HE, Kwon HB, Baek D, Yi BY, Byun MO. Expression of StMYB1R-1, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance. *Plant Physiol* 2011; **155**: 421-432.
[90] Sridha S, Wu K. Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006; **46**: 124-133.
[91] Stephenson TJ, Mcintyre CL, Collet C, Xue GP. Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum*. *Plant Mol Biol* 2007; **65**: 77-92.
[92] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3- MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 447-456.
[93] Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. Stress responsive zinc finger gene zpt2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J* 2003; **36**: 830-841.
[94] Sun W, Bernard C, Van De Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J* 2001. **27**: 407-415.
[95] Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 196-203.
[96] Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2004; **16**: 2001-2019.
[97] Tan MP. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiol Biochem* 2010; **48**: 21-26.
[98] Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F et al. Coexpression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *Plant J* 2007; **49**: 46-63.
[99] Trindade I, Capitao C, Dalmay T, Fevereiro MP, Santos DM. miR398 and miR408 are upregulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 2010; **231**: 705-716.
[100] Tripathi P, Rabara RC, Rushton PJ. A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants. *Planta* 2014; **239**: 255-266.
[101] Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi – Shinozaki K. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**: 11632-11637.
[102] Van Dijk K, Ding Y, Malkaram S, Riethoven JJM, Liu R, Yang J, Laczko P, Chen H, Xia Y, Ladunga I, Avramova Z, Fromm M. Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 2010; **10**: 238.
[103] Vaseva I, Sabotic J, Sustar-Vozlic J, Meglic V, Kidric M, Demirevska K, Simova-Stoilova L. The Response of Plants to Drought Stress: The Role of Dehydrins, Chaperones, Proteases and Protease Inhibitors in Maintaining Cellular Protein Function. In Neves DF and Sanz JD eds. Droughts: New Research, 2012; 1-46.
[104] Wang C, Deng P, Chen L, Wang X, Ma H, Hu W, Yao N, Feng Y, Chai R, Yang G, He G. A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. *PLoS One* 2013; **8**: e65120.

[105] Wang T, Chen L, Zhao M, Tian Q, Zhang W. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genomewide highthroughput sequencing. *BMC Genomics* 2011; **12**:367.

[106] Wang WS, Pan YJ, Zhao XQ, Dwivedi D, Zhu LH, Ali J, Fu BY, Li ZK. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 2011; **62**: 1951-1960.

[107] Wei L, Zhang D, Xiang F, Zhang Z. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *Int J Plant Sci* 2009; **170**: 979-989.

[108] Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep* 2009; **28**: 21-30.

[109] Xia N, Zhang G, Liu X, Deng L, Cai G, Zhang Y, Wang XJ, Zhao J, Huang LL, Kang ZS. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep* 2010; **37** :3703-3712.

[110] Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 2007; **115**: 35-46.

[111] Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol* 2006; **142:** 1065-1074.

[112] Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water defcit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 1996; **110**:249-257.

[113] Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters* 2008; **582**: 1037-1043.

[114] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 1994; **6**: 251-264.

[115] Yang F, Yu D. Overexpression of *Arabidopsis* miR396 enhances drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Acta Bot Yunnanic* 2009; **31**: 421-426.

[116] Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y. Narrowing down the targets: Towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol Plant* 2010; **3**: 469-490.

[117] Yoon EK, Yang JH, Lim J, Kim SH, Kim SK, Lee WS. Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 1382-1391.

[118] Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 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. *Plant J* 2010; **61**:672-685.

[119] Zhang CY, Wang NN, Zhang YH, Feng QZ, Yang CW, Liu B. DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*). *Genet Mol Res* 2013; **12**: 1269-1277.

[120] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecke JR. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 2006; **126**: 1189-1201.

[121] Zhang X, Zou Z, Gong P, Zhang J, Ziaf K, Li H, Xiao F, Ye Z. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol Lett* 2011; **33**: 403-409.

[122] Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **354**: 585-590.

[123] Zheng X, Chen L, Li M, Lou Q, Xia H, Wang P, Li T, Liu H, Luo L. Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PLoS One* 2013; **8**(11):e80253.

[124] Zhou LG, Liu YH, Liu ZC, Kong DY, Duan M, Luo LJ. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot* 2010; **61**: 4157-4168.

[125] Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J* 2008; **6**: 486-503.
[126] Zhu JK. Epigenome sequencing comes of age. *Cell* 2008; **133**: 395-397.
[127] Zong W, Zhong X, You J, Xiong L. Genome-wide profilingof histone H3K4-tri-methylation and gene expression in rice under drought stress. *Plant Mol Biol* 2013; **81**: 175-188.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 13.03.2014
Przyjęto: 15.05.2014
Małgorzata Garnczarska
Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań
e-mail: garnczar@amu.edu.pl
tel.: 618295894
fax: 618295887