

Uloga porodice gena asr u odgovoru na stres kod biljaka

Komazec, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:888283>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA PORODICE GENA ASR U ODGOVORU NA STRES KOD
BILJAKA

THE ROLE OF ASR GENE FAMILY IN PLANT STRESS
RESPONSE

SEMINARSKI RAD

Bruno Komazec
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Asr proteini u biljkama.....	2
2.1. Evolucijska povijest <i>asr</i> porodice gena.....	2
2.2. Asr proteini u rajčici (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	6
2.2.1. Struktura i lokalizacija	6
2.2.2. Ekspresija porodice gena <i>asr</i>	8
2.2.2.1. Ekspresija <i>asr</i> gena u vegetativnim tkivima	8
2.2.2.2. Ekspresija <i>asr</i> gena u reproduktivnim tkivima	8
2.2.2.3. Ekspresija <i>asr</i> gena u odgovoru na abscizinsku kiselinu te faktore stresa.....	9
2.3. Asr proteini u ljiljanu (<i>Lilium longiflorum</i>)	9
2.4. Asr proteini u banani (<i>Musa acuminata</i> L.)	10
3. Mehanizam djelovanja te fiziološki efekt Asr proteina	13
4. Buduće biotehnoške primjene	17
5. Zaključak	18
6. Literatura	20
7. Sažetak	24
8. Summary	24

1. Uvod

Na dnevnoj bazi biljke su izložene raznim stresnim uvjetima poput velikih varijacija temperature, nepovoljnim razinama minerala te nedostatku vode. Suša i salinitet su dva faktora abiotičkog stresa koji se često javljaju zajedno te utječu na rast i produktivnost biljaka diljem svijeta. Zbog navedenog razloga sve se više proučava fiziologija biljaka u stresnim uvjetima. U obrani od navedenih nepovoljnih faktora, biljke su razvile mnoštvo odgovora na abiotičke faktore stresa kako bi preživjele navedene nepovoljne uvjete. Ti odgovori uključuju fiziološke, metaboličke, biokemijske te molekularne promjene (Kalifa i sur., 2004a). Jedan od zastupljenijih načina obrane u nepovoljnim uvjetima jest promjena u ekspresiji gena. U eukariotskom genomu često se pojavljuju porodice gena. Razlike u funkciji i ekspresiji proteina unutar iste porodice dovele su do plastičnosti i noviteta u evoluciji vrsta (Ohta, 1989).

Asr (*Abscisic acid-, stress-, ripening – induced*) porodica gena je visoko rasprostranjena u biljnom carstvu. Prvi član navedene porodice gena, *asr1*, otkriven je 1993. godine u biljci rajčice (*Lycopersicon esculentum*) pretraživanjem zbirke komplementarne DNA (cDNA) te usporedbom sa cDNA listova biljaka koje su izložene stresnim uvjetima (Iusem i sur., 1993). Ostali članovi porodice gena *asr* su kasnije pronađeni u rajčici, čime je otkriveno postojanje porodice gena (Rossi i sur., 1996). Od pronalaska prvog *asr* gena, mnogo njegovih ortologa je pronađeno u velikom broju biljnih vrsta u različitom broju kopija, uključujući golosjemenjače i kritosjemenjače. *Asr* geni su pronađeni u jednosupnica i dvosupnica, dok u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*), biljci često korištenoj kao modelni organizam, nedostaje navedene porodice gena (Yang i sur., 2005). Ortolozi *asr* porodice gena nisu pronađeni izvan biljnog carstva (Golan i sur., 2014).

Asr geni kodiraju male, visoko nabijene proteine grupirane u skupinu hidrofilinga, poznatih kao LEA (*late embryogenesis abundant*) proteini koji su uključeni u adaptaciju biljke na manjak vode (Battaglia i sur., 2008). *Asr* proteini posjeduju transaktivacijske sposobnosti te sposobnosti slične šaperonima (Kalifa i sur., 2004a). Funkcionalna analiza otkriva da su *Asr* proteini uključeni u biljni razvoj, dozrijevanje ploda, starenje, ali također igraju značajnu ulogu pri adaptaciji biljke na različite abiotičke stresove, ponajviše salinitet i sušu te su, među ostalim, inducirani i abscizinskom kiselinom (ABA) (Zhang i sur., 2015).

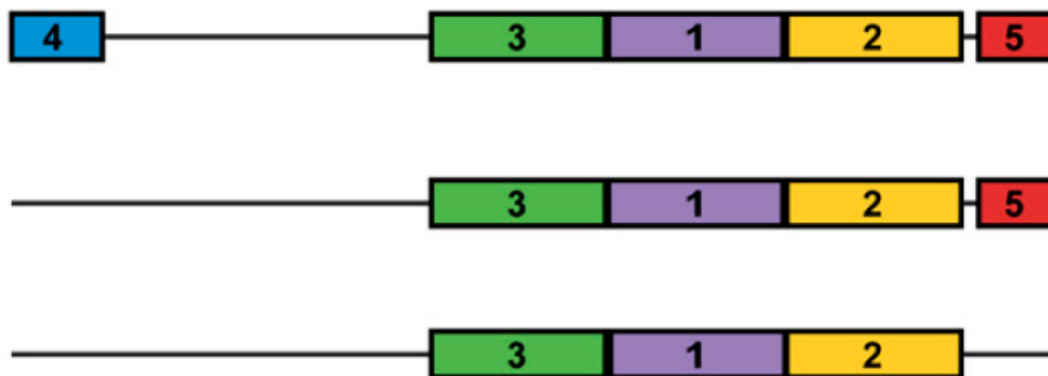
2. Asr proteini u biljkama

Kao što je ranije navedeno, porodica gena *asr* je rasprostranjena po biljnom carstvu. Nalazimo je u golosjemenjača te kritosjemenjača. Od prvotnog otkrića Asr proteina u rajčici, pronađeni su Asr homolozi u drugim biljkama kao što su: krumpir (*Solanum tuberosum*; Schneider i sur., 1997), kukuruz (*Zea mays*; Meyer, 1995), pomelo (*Citrus maxima*; Canel i sur., 1995), ljiljan (*Lilium logiflorum*; Wang i sur., 2005), grožđe (*Vitis vinifera*; Cakir i sur., 2003), riža (*Oryza sativa* L.; Vaidyanathan i sur., 1999) i slično.

Svi poznati *asr* geni sadrže dvije visoko konzervirane regije (Slika 1.) (Yang i sur., 2005). Prva regija sadrži niz histidinskih ostataka na amino kraju (N-kraj) što omogućuje specifično vezanje na određenu sekvencu DNA pomoću cinkova kationa (Kalifa i sur., 2004b). Druga regija je dio karboksilnog kraja (C-kraj) koji često sadrži jezgrin lokalizacijski signal (NLS) (Cakir i sur., 2003). Ekspresija i broj *asr* gena se razlikuje između vrsta te se velika većina navedenih gena sastoji od dva eksona i jednog introna varijabilne duljine (Fischer i sur., 2011).

Grupa 7 (ASR)

PFAM:PF02496



Slika 1. Visoko konzervirane regije u Asr proteinima. Motivi označeni sa brojevima 1, 2 i 5 predstavljaju prvu konzerviranu regiju na N-kraju s nizovima histidina. Motiv označen s brojem 3 označava C-terminalnu, konzerviranu regiju koja sadrži NLS. Prilagođeno na temelju Battaglia i sur., 2008

2.1. Evolucijska povijest *asr* porodice gena

Jednostavna struktura *asr* gena iz rajčice, dva eksona i jedan intron, se pojavljuje i u ostalim vrstama kao što su vrste roda *Musa* (plantana i obična banana; Henry i sur., 2011) te u biljci *Salicornia brachiata* (Battaglia i sur., 2008).

Uspoređujući članove porodice gena *asr* komercijalno dostupne rajčice sa njihovim ortolozima u drugoj, divljoj *Solanum* vrsti, dobiveni su različiti rezultati za različite članove porodice gena. *Asr1* gen kroz svoju sekvencu sadrži malu razinu nesinonimnih supstitucija što upućuje na jaku negativnu selekciju (Fischer i sur., 2011; Frankel i sur., 2006). S druge strane, gen *asr2* sadrži veći omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija kada je uspoređivan sa vrstama koje se prirodno nalaze u suhim područjima. Navedeni veći omjer upućuje na pozitivnu, adaptivnu selekciju na gen *asr2* tokom evolucije (Frankel i sur., 2003). Za isti gen su pronađene i intraspecifične varijacije između populacija divljih rajčica koje žive u različitim klimama (Giombini i sur., 2009). Nadalje, regulatorna regija navedenog, *asr2*, gena podvrgnuta je pozitivnoj selekciji u vrsti rajčice *Solanum chilense*, vrsti prilagođenoj na život u suhom okolišu (Fischer i sur., 2013), ali dokazi za adaptivnu evoluciju istog gena nisu pronađeni u kodirajućoj sekvenci, za razliku od *asr4* gena (Fischer i sur., 2011).

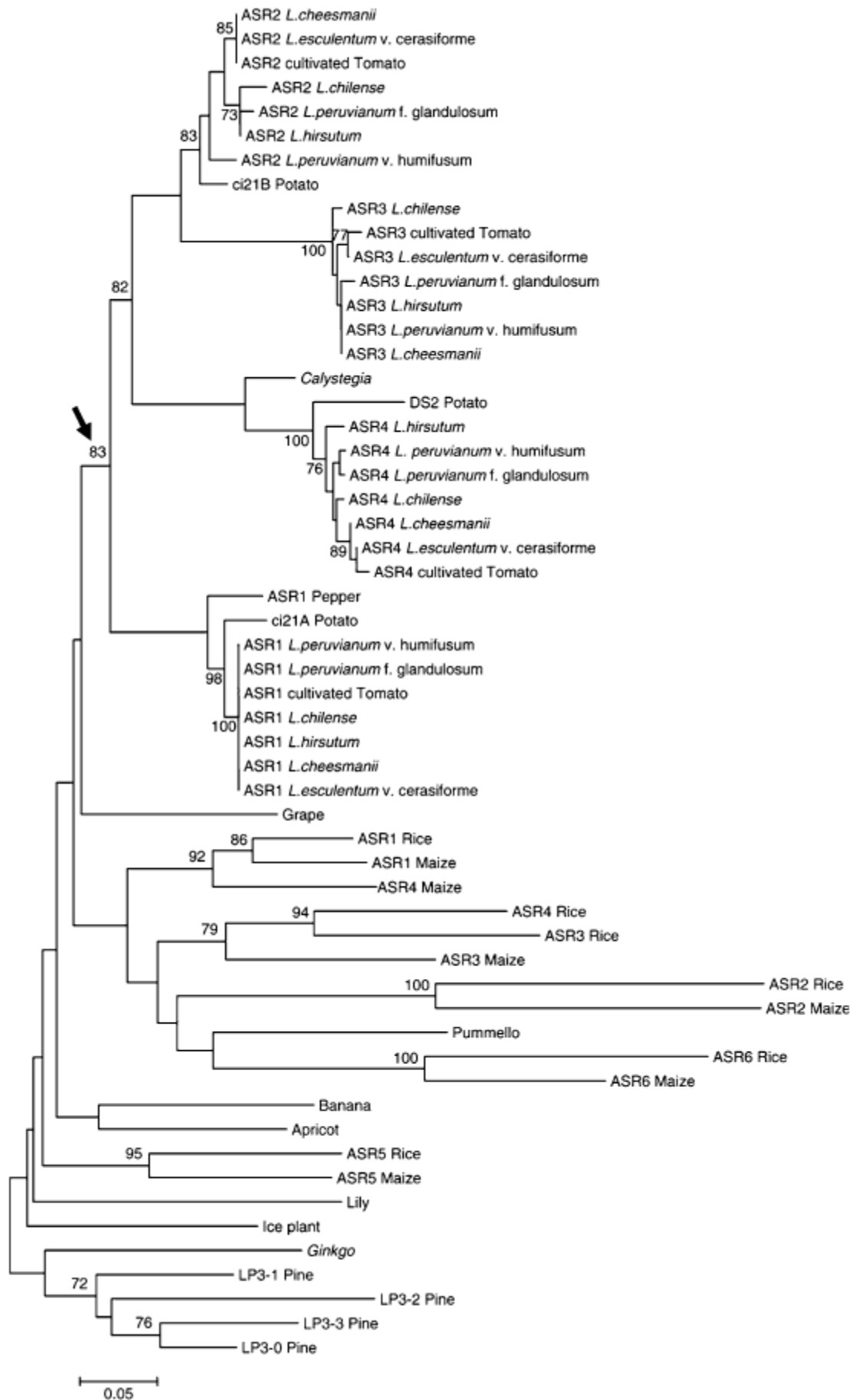
Uspoređujući *asr* gene između rajčice (*asr1*, *asr2*...) i krumpira (*ci21a*, *ci21b*) vidljivo je da su ortološki geni (*asr1* – *ci21a*; *asr2* – *ci21b*) puno sličniji nego paralogni geni (*asr1* – *asr2*; *ci21a* – *ci21b*). Daljnjom analizom navedenih usporedbi je otkriveno da je porodica gena *asr* vrlo stara, oko 300 milijuna godina, te da njen početak proizlazi iz duplikacije gena koja se odvila prije razdvajanja filogenetskih grana rajčice i krumpira. *Asr3* gen iz rajčice nema svog ortologa u krumpiru iz čega se može zaključiti da je taj gen jedinstven za biljku rajčice. Slična evolucijska povijest može se vidjeti prilikom promatranja *asr* gena u riži i kukuruzu, gdje se opet javlja veća sličnost između njihovih ortologa nego između njihovih paraloga (Frankel i sur., 2006). S druge strane, *Asr* proteini iz roda *Musa* (plantana i obična banana) su puno sličniji međusobno nego sa *Asr* proteinima iz ostalih vrsta što indicira da su ti *asr* geni produkt relativno nedavnih duplikacijskih događaja (Henry i sur., 2011).

Za razliku od rajčice, *asr* geni u riži (*OsAsr1*, *OsAsr2*,..., *OsAsr6*) se nalaze na različitim kromosomima. *OsAsr1* i *OsAsr2* se nalaze međusobno blizu na kromosomu 1, što je najvjerojatnije rezultat relativno nedavnog duplikacijskog događaja dok se *OsAsr6* nalazi na udaljenom mjestu na istom kromosomu. Ostala tri gena (*OsAsr3*, *OsAsr4*, *OsAsr5*) se nalaze na različitim kromosomima. Navedena raznolikost, moguće je rezultat duplikacijskih događaja na razini segmenata kromosoma ili na razini cijelog genoma (Philippe i sur., 2010).

Raznolikost u evolucijskoj povijesti gena pronađena je i prilikom proučavanja običnog graha (*Phaseolus vulgaris*) koji sadrži dva *asr* gena, *asr1* i *asr2*. Naime, *asr1* gen sadrži malo nukleotidnih varijacija između kultiviranog i divljeg graha što upućuje na snažnu negativnu

selekciju. S druge strane, analizom *asr2* gena može se zaključiti da je gen bio podvrgnut snažnoj adaptivnoj selekciji (Cortes i sur., 2012).

Kako bi se prikazala cjelokupna slika odnosa između Asr proteina u terminima njihove sekvence, prikazano je filogenetsko stablo na Slici 2. (Frankel i sur., 2006).



Slika 2. Filogenetsko stablo Asr proteina iz različitih biljnih vrsta dobiveno metodom susjednog sparivanja (*Neighbour – joining tree*). Brojevi u čvorovima su vrijednosti *bootstrapa* (samo vrijednosti > 70% su prikazane). Duljina crte prikazuje *p* – udaljenost. Strelica pokazuje na grupu rajčica/krumpir. Stablo je ukorijenjeno sa vanjskom grupom Ginko-Pine (golosjemenjače). Preuzeto iz Frankel i sur., 2006

2.2. Asr proteini u rajčici (*Lycopersicon esculentum*)

Asr porodica gena prvotno je otkrivena u plodu rajčice (Iusem i sur., 1993). Navedena porodica gena se sastoji od 5 gena (*asr1*, *asr2*, *asr3*, *asr4*, *asr5*) koji se nalaze na kromosomu 4 te su njihovi lokusi prikazani u Tablici 1 (Golan i sur., 2014).

Tablica 1. Lokusi *asr* gena u rajčici

Gen	Lokus
<i>asr1</i>	Solyc04g071610
<i>asr2</i>	Solyc04g071580
<i>asr3</i>	Solyc04g071590
<i>asr4</i>	Solyc04g071620
<i>asr5</i>	Solyc04g071600

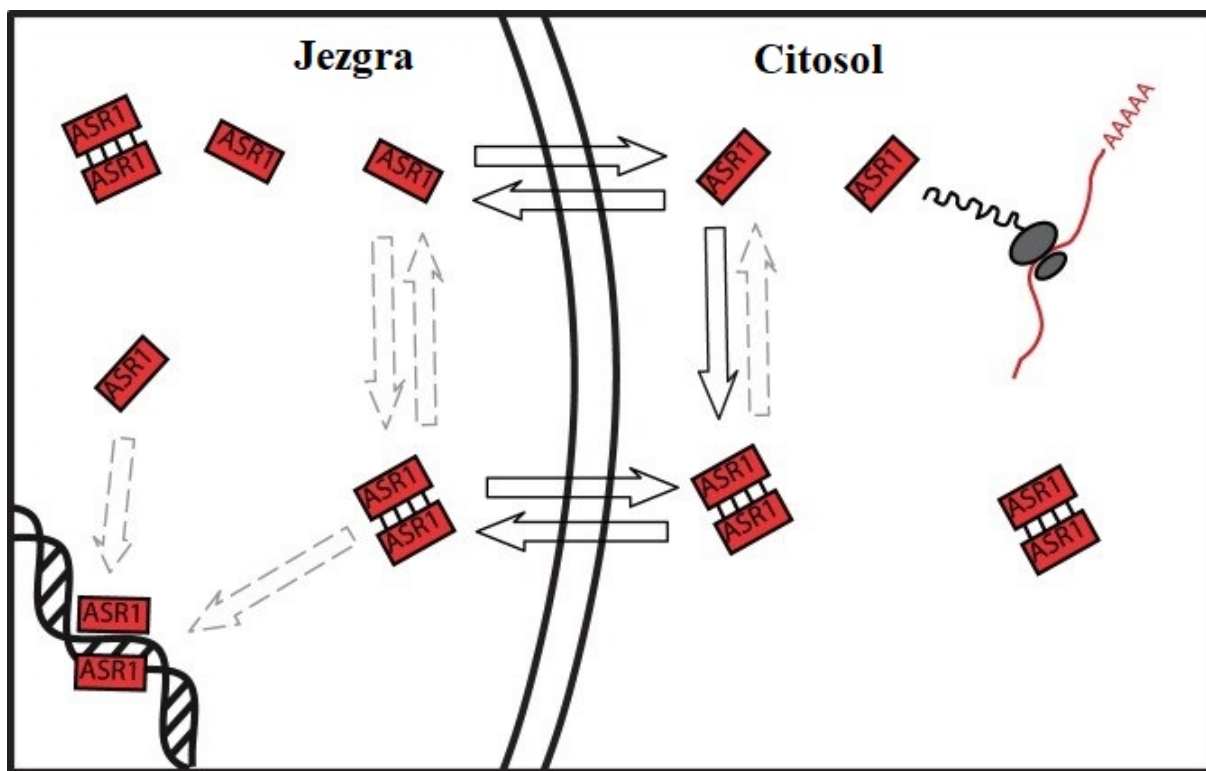
2.2.1. Struktura i lokalizacija

Asr proteini su okarakterizirani konzerviranom ABA/WDS (abscizinska kiselina/stres manjka vode) aminokiselinskom domenom (Canel i sur., 1995). Neki proteini sadrže DNA vezujuću domenu ovisnu o cinku (Kalifa i sur., 2004b).

Asr geni svrstani su u grupu hidrofilina koji su okarakterizirani sa visokim sadržajem glicina te hidrofilnosti. Četiri gena (*asr1*, *asr2*, *asr3*, *asr5*) kodiraju proteine male molekularne mase koji sadrže oko 110 aminokiselinskih ostataka dok gen *asr4* kodira protein približno dvostruko veće molekulske mase od ostalih Asr proteina, odnosno Asr4 protein sadrži 297 aminokiselina (Frankel i sur., 2006; Golan i sur., 2014). Divlje vrste rajčice također kodiraju istih 5 Asr proteina iz čega se može zaključiti da se ova porodica gena nije izgubila tijekom domestikacije i uzgoja rajčice (Fischer i sur., 2013).

Asr1 gen iz rajčice kodira mali, visoko nabijeni polipeptid molekularne mase od 13 kDa sa izoelektričnom točkom od 7,9 (Amitai-Zeigerson i sur., 1995; Iusem i sur., 1993). Navedeni, Asr1 proteini sadrže dualnu substaničnu lokalizaciju. Naime, nalaze se u citosolu, kao nativno neuređeni proteini, odnosno ne posjeduju fiksiranu trodimenzionalnu strukturu, te se nalaze u jezgri, kao strukturirani homodimeri ili monomeri koji se mogu vezati na DNA

(Slika 3) (Kalifa i sur., 2004b). Navedena, neuređena struktura Asr1 proteina u citosolu, omogućila im je šaperonsko djelovanje, odnosno mogućnost stabiliziranja određenog broja proteina od denaturacije uslijed djelovanja topline i ciklusa zaleđivanja i topljenja (Philippe i sur., 2010). Dualna substanična lokalizacija također je potvrđena i za Asr proteine mnogih vrsta, među ostalima i u polenu ljiljana dok je Asr1 protein u riži pokazao isto šaperonsko djelovanje (Wang i sur., 2005). *Asr2* gen sadrži 2029 parova baza. Kodirajuća regija sadrži 309 parova baza te kodira vrlo srodni polipeptid Asr1 proteinu sa 85% homologije (Rossi i Iusem, 1994). Kodirajuća regija *asr1* gena pokazuje 76% homologije sa kodirajućom regijom gena *asr3* (Rossi i sur., 1996). Nadalje, *asr5* gen pokazuje visoku sličnost u sekvenci sa *asr3* genom što nerijetko otežava razlikovanje ekspresije navedenih gena. Navedeni geni (*asr1-asr3*, *asr5*) kodiraju manje polipeptide u veličini od oko 110 aminokiselina dok gen *asr4* kodira polipeptid u veličini od 297 aminokiselina (Golan i sur., 2014).



Slika 3. Asr1 monomeri i dimeri mogu ulaziti i izlaziti iz jezgre jednostavnom difuzijom bez ovisnosti o NLS-u. Dimeri proteina se formiraju u citosolu te odlaze u jezgru, ali mogu biti i formirani u jezgri. Asr1 može vezati DNA kao monomer ili kao dimer. Puna linija označava dokazane događaje dok isprekidana linija predstavlja događaje koji nisu još dokazani *in vivo*. Prilagođeno na temelju Ricardi i sur., 2012

2.2.2. Ekspresija porodice gena *asr*

Asr geni imaju značajnu ulogu u uvjetima suše te drugim abiotičkim faktorima stresa. U biljkama koje se nalaze u fiziološkim uvjetima, *asr1* i *asr4* geni su visoko ekspresirani za razliku od ostalih članova porodice gena (*asr2*, *asr3*, *asr5*) čija je razina transkripata dva do tri reda veličine manja (Golan i sur., 2014).

Asr1 gen je najviše ekspresiran u korijenju, stabljici, prašnicima, tučcima te plodovima. S druge strane, 2/3 ukupnih *asr* transkripata u listovima, vršnim meristemima izdanka te lapovima i laticama pripada *asr4* genu. U listovima i plodovima razina *asr1* i *asr4* transkripata je relativno velika dok je razina ekspresije ostalih članova porodice gena *asr* vrlo mala. U mladim listovima razina *asr4* transkripata je 2,6 puta veća od razine *asr1* transkripata dok su razine ostalih *asr* gena manje za dva reda veličine. U korijenju, najveću razinu transkripata od navedene porodice gena *asr* ima gen *asr1* dok *asr3*, *asr4* te *asr5* transkripata ima manje za jedan red veličine te *asr2* transkripata ima manje za dva reda veličine (Golan i sur., 2014).

2.2.2.1. Ekspresija *asr* gena u vegetativnim tkivima

U korijenju i stabljici nalaze se najviše razine *asr1* transkripata, dok njegova razina u listu opada sa pripadnim razvojem lista (Amitai-Zeigerson i sur., 1995; Golan i sur., 2014). Značajno velika ekspresija *asr1* gena u stabljici i korijenju pokazuje možebitnu ulogu produkta navedenog gena u vaskularnom sustavu biljke (Maskin i sur., 2008). S druge strane, razina *asr2* transkripata se ne mijenja značajno u vegetativnim organima biljke te je ta razina vrlo mala. Ekspresija *asr3* i *asr5* gena je najviša u kotiledonima, gdje postižu sličnu razinu transkripcije kao i onu *asr1* gena što može predložiti ulogu *asr3* i/ili *asr5* produkta gena u naprednim stadijima sjemenog razvoja. Za razliku od prije navedenih članova porodice gena *asr*, relativno mala razina *asr4* transkripata se može pronaći u korijenju i stabljici dok je glavnina ekspresije bazirana u listovima, kotiledonima te meristemu (Golan i sur., 2014).

2.2.2.2. Ekspresija *asr* gena u reproduktivnim tkivima

Porodica gena *asr* je različito ekspresirana u cvjetnim organima. Ekspresija gena *asr2*, *asr3* te *asr5* varira u različitim cvjetnim organima, ali je njihova razina transkripata dva reda veličine manja od razine *asr1* te *asr4* transkripata. Navedeni geni, *asr1* te *asr4*, su najviše ekspresirani u lapovima i prašnicima te u manjoj mjeri u laticama i tučcima. U laticama i lapovima veća je ekspresija *asr4* gena dok je u prašnicima i tučcima najviše ekspresiran *asr1* gen. U mladim, nezrelim plodovima nalazi se najviše *asr1* transkripata nego u bilo kojem drugom tkivu te se ekspresija navedenog, *asr1*, gena povećava tijekom razvoja ploda (Iusem i

sur., 1993; Golan i sur., 2014). U plodovima se još nalaze i najviše razine transkripata *asr2*, *asr3* te *asr5* gena nego u bilo kojem drugom djelu biljke, ali je njihova razina u plodu manja od razine transkripata *asr1* gena za dva reda veličine (Golan i sur., 2014).

2.2.2.3. Ekspresija *asr* gena u odgovoru na abscizinsku kiselinu te faktore stresa

Odgovor biljke na abiotičke stresne faktore je kompleksan te uključuje kaskadu događaja (Amitai-Zeigerson i sur., 1995). Nakon izlaganja biljke rajčice različitim abiotičkim stresovima kao što su voda, salinitet, osmotski stres ili hormonu ABA, stalne razine *asr1* te *asr4* transkripata su povećane. Navedena dva gena su jako eksprimirana u biljci te su njihove relativne razine indukcije, nakon djelovanja ranije navedenim tretmanima, vrlo slične (Golan i sur., 2014). Koncentracija *Asr1* proteina pratila je ekspresiju glasničke RNA (mRNA) navedenog gena što pokazuje da je taj gen reguliran primarno razinom mRNA u stanici, a ne raznim translacijskim ili posttranslacijskim koracima (Amitai-Zeigerson i sur., 1995). Također je pokazano da je opseg odgovora biljke na nepovoljne uvjete koreliran sa jačinom stresa izloženog biljci. Time je omogućeno precizno podešavanje razine produkta *asr1* gena u odgovoru na stres preko njegovog regulacijskog mehanizma. S druge strane, manje eksprimirani geni *asr* porodice gena, *asr2*, *asr3*, *asr5*, imaju različiti odgovor na ranije navedene tretmane. *Asr2* je najviše induciran nakon tretiranja biljke s abscizinskom kiselinom te u manjoj mjeri odgovara na osmotski stres te salinitet. Na gene *asr3* te *asr5*, hormon ABA nema značajnog utjecaja na njihovu ekspresiju dok s druge strane, navedeni geni su visoko eksprimirani nakon izlaganja povećanom salinitetu što upućuje da su *asr3* i *asr5* geni inducirani preko staničnog puta neovisnog o abscizinskoj kiselini (Golan i sur., 2014).

Kako je već ranije navedeno, velik broj *asr* ortologa se nalazi u biljnom carstvu. Mnogi *asr* geni u različitim biljnim vrstama su identificirani preko njihovog odgovora na abiotičke stresove (Vaidyanathan i sur., 1999; Cakir i sur., 2003).

2.3. *Asr* proteini u ljiljanu (*Lilium longiflorum*)

Član *asr* porodice gena nalazi se i u biljci ljiljanu te je nazvan *lla23*. Navedeni gen kodira mali hidrofilni protein sa molekularnom masom od 16 kDa te izoelektričnom točkom od 6,1. Navedeni, *Lla23*, protein je specifičan za polen ljiljana (Wang i sur., 1998). *Lla23* protein se većim djelom nalazi u citoplazmi, iako na C-kraju sadrži jezgrin lokalizacijski signal te može vezati DNA. Navedeni protein ima dualnu ulogu u stanici, djeluje kao regulator, ali i kao obrambena molekula u uvjetima nedostatka vode (Yang i sur., 2005).

Za normalnu kontrolu signalnih putova u stanici potrebni su pozitivni i negativni regulatori u stanici. Lla23 protein je jedan od navedenih regulatora. Naime, prekomjernom ekspresijom *lla23* gena, sjemenke pokazuju smanjenu osjetljivost na abscizinsku kiselinu tokom klijanja, biljke pokazuju smanjenu dormanciju, dok se i u sjemenkama i u čitavim biljkama javlja veći otpor na salinitet, sušu te osmotski stres (Yang i sur., 2005). Postojanje NLS-a na C-kraju proteina potvrđuje regulatornu ulogu Lla23 proteina (Wang i sur., 2005).

U uvjetima suše te visokog saliniteta, protein Lla23 posjeduje obrambenu ulogu u biljci. Naime, pri navedenim, nepovoljnim uvjetima, biljka sadrži dvije razine zaštite. Jedna od njih jest visoka hidrofilnost Lla23 proteina koja za rezultat ima pojačano zadržavanje vode u biljci. Nadalje, druge zaštitne molekule protiv osmotskog stresa su pojačano eksprimirane djelovanjem *lla23* gena. Nakupljanje povećane količine Lla23 proteina u zreloom polenu potvrđuje zaštitnu ulogu navedenog proteina. Druga razina zaštite dolazi od regulatornih svojstava navedenog proteina. Naime, pojačana ekspresija određenih zaštitnih proteina kao što su Rd29b te Kin2 upućuje na postojanje uloge Lla23 proteina kao medijatora za signalizaciju ABA-e u odgovoru na stresne uvjete (Yang i sur., 2005). Sličnu regulatornu ulogu moguće je pronaći i u Asr proteinima drugih vrsta kao što je uloga Asr1 proteina u rajčici u pojačanoj ekspresiji određenih gena zaslužnih za odgovor na sušu te povećani salinitet (Kalifa i sur., 2004a). Pri početnom odgovoru na sušu, ne javlja se povećana razina abscizinske kiseline te puči ostaju otvorene. Takav odgovor je objašnjen zbog djelovanja Lla23 proteina u zadržavanju vode. Dužim sušnim periodom dolazi do povećanja ABA-e što rezultira u zadržavanju vode u biljci (Yang i sur., 2005).

Lla23 protein ima i ulogu u razvoju polena. Nakupljanje navedenog proteina u razvoju antera povezano je sa isušivanjem koje se prirodno javlja malo prije otvaranja cvijeta (Wang i sur., 1998). Dehidracija sjemena je važna točka u njegovom razvoju gdje dolazi do promijene iz razvojnog procesa u proces klijanja (Kermode, 1990). Sam Lla23 protein u citoplazmi osušenog polena ima ulogu u zaštiti drugih makromolekula od isušivanja (Huang i sur., 2000).

2.4. Asr proteini u banani (*Musa acuminata* L.)

Banana je jedna od najpopularnijih svjetskih voća te su, kao takve, plantaže banana od visoke ekonomske važnosti. Banane su zbog svojeg plitkog korijenja te stalne zelene boje nadzemnog djela biljke, značajno osjetljive na gubitak vode (Sreedharan i sur., 2013). Bolje razumijevanje mehanizama obrane od nedostatka vode pomaže u povećavanju produkcije navedenog ploda te njihove kvalitete.

Kako je već navedeno, *asr* geni kodiraju male proteine važne u odgovoru biljke na raznolike stresne uvjete. U banani je pronađeno četiri *asr* gena (*masr*) od kojih svaki sadrži karakteristični ABA/WDS motiv te gensku strukturu od 2 eksona i jednog introna (Slika 4). Proteini pokazuju dualnu lokalizaciju u jezgri i u citoplazmi (Henry i sur., 2011).



Slika 4. Struktura porodice gena *masr*. Svaki od 4 člana porodice gena sadrži dva eksona (kvadrati) koji su razdvojeni jednim intronom (linija). Potamnjeni dijelovi eksona prikazuju njegove dijelove koji sadrže ABA/WDS domenu. Brojevi iznad eksona i introna predstavljaju duljinu tih elemenata (parovi baza-pb). Preuzeto iz Henry i sur., 2011

Sva četiri *masr* gena su međusobno filogenetski vrlo blizu, u odnosu na druge *asr* gene iz drugih vrsta. Tri od četiri člana porodice gena nalaze se bliže, dok je četvrti član (*masr4*) udaljeniji. Smatra se da je jedan ili više *masr* homologa nastalo duplikacijskim događajima na razini cijeloga genoma (Henry i sur., 2011). Drugo istraživanje procjenjuje da se duplikacijski događaj, specifičan za rod *Musa*, dogodio prije, otprilike, 61 milijun godina (Lescot i sur., 2008).

Svi *masr* članovi su sveprisutno eksprimirani. Pokazano je da je minimalno jedan alel od svakog *masr* gena eksprimiran u raznim tkivima (korijenje, listovi, meristemi, gomoljima i sl.). Razina ekspresije različitih gena varira u ovisnosti o sorti te o razvojnem stadiju tkiva (Henry i sur., 2011). U meristemima banane, mAsr1 protein se nalazi u najvećoj količini, mAsr4 u značajno manjoj mjeri dok se proteini mAsr2 i mAsr3 ne nalaze u meristemima (Carpentier i sur., 2007).

Kako je već navedeno, Asr proteini svrstani su u skupinu LEA proteina. Sadrže dvije glavne, konzervirane domene koje su podijeljene u 5 manjih domena (Slika 1). U mAsr proteinima iz banane pronađene su svih pet domena, osim u mAsr4 proteinu u kojemu nedostaje domena 5 (Henry i sur., 2011).

U banani je otkriven još jedan član *asr* gena nazvan *maasr*. Navedeni gen se sastoji od 683 parova baza te kodira polipeptid s kraćom sekvencom na N-kraju koja sadrži šest

histidina te dužom sekvencom na C-kraju koja sadrži ABA/WDS domenu, kao i ostali Asr proteini. MaAsr protein ima ulogu u regulaciji fotosinteze (Zhang i sur., 2015). Naime, fotosinteza je jedan od primarnih procesa na koje značajno utječe nedostatak vode (Chaves, 1991) te biljke sa prekomjernom ekspresijom *maasr* gena imaju manju površinu listova što upućuje na ulogu MaAsr proteina u regulaciji fotosinteze. Druga uloga MaAsr proteina jest u regulaciji, odnosno inhibiciji respiracije u uvjetima dehidracije. Naime, navedeni protein može direktno vezati veliki broj gena vezanih za lanac transporta elektrona te uzrokovati smanjenje NADH-ubikinon oksidoreduktaze te citokrom c oksidaze. Daljnje uloge MaAsr proteina uključuju regulaciju metabolizma ugljikohidrata te fitohormona, kao što je ABA, i prijenos signala (Zhang i sur., 2015).

3. Mehanizam djelovanja te fiziološki efekt Asr proteina

Veliku ulogu u otpornosti biljaka na stres imaju Asr proteini. Ta otpornost je dobivena preko najmanje dva mehanizma koji djeluju simultano (Dominguez i Carrari, 2015). Prvi mehanizam opisuje djelovanje nestrukturiranog Asr1 proteina kao šaperona u citoplazmi gdje je pokazano da Asr1 proteini iz ljiljana, rajčice te plantana banane mogu spriječiti denaturaciju enzima nakon zagrijavanja ili ciklusa zaleđivanja (Hsu i sur., 2011). S druge strane, Asr1 proteini, nakon dobivanja kvarterne strukture, djeluju kao transkripcijski faktori (Dominguez i Carrari, 2015). Navedeni mehanizmi su, nadalje, potvrđeni i dualnom lokalizacijom navedenog, Asr1, proteina u citosolu i jezgri (Philippe i sur., 2010; Fischer i sur., 2013) te njegovom ulogom kao DNA vezujućeg proteina (Philippe i sur., 2010).

Asr1 protein iz rajčice ostvaruje fizičku interakciju sa regulatornim regijama gena zaslužnih za sintezu te pregradnju stanične stijenke kao što su celuloza sintaza te glukanaza (Ricardi i sur., 2014), ali i sa kanalima zaslužnim za tok vode i otopljenih tvari kao što su akvaporini (Battaglia i sur., 2008). Kontrola puči biljke je centralna u prevenciji gubitka vode preko osmotskog stresa. Jedan od primjera djelovanja Asr1 proteina prilikom stresa jest i povećana ekspresija gena koji kodira protein za transfer lipida (AY562132; Kalifa i sur., 2004a). Navedeni gen posjeduje visoku homologiju sa genom *NgLtp* koji je eksprimiran u stanicama zapornicama u pučima prilikom vodnog stresa (Smart i sur., 2000). Prilikom izlaganja biljke soli dolazi do promijene u homeostazi iona (Blumwald, 2000). Prekomjerna ekspresija *asr1* gena specifično utječe na sumu unosa natrijevih iona (Na^+) u stanicu. To je moguće postići na dva načina: smanjivanje unosa Na^+ ili povećano izlučivanje istih (Kalifa i sur., 2004a).

Funkcionalna analiza Asr1 proteina preko korištenja transgeničnih biljaka pokazuje da metabolički efekt navedenog proteina ovisi o vrsti biljke, ali i o samom tkivu (Dominguez i Carrari, 2015). Razina Asr1 proteina je obrnuto proporcionalna s razinom glukoze u listovima *asr1* transgeničnih biljaka duhana i kukuruza. Razina mRNA gena za transporter heksoze 1 (Ht1) se smanjuje u listovima duhana u kojima je utišana ekspresija *asr1* gena (Dominguez i sur., 2013). Naime, Ht1 je transporter na plazma membrani sa visokim afinitetom za glukozu te je uključen u povratak heksoza iz apoplasta u floemsku regiju vaskularnog sustava kod listova, peteljka te plodova grožđa (Vignault i sur., 2005; Slewinski, 2011). Asr1 protein potiče ekspresiju *ht1* gena u listovima duhana te na taj način regulira unos glukoze u stanice pratilice floema iz apoplasta (Dominguez i Carrari, 2015). S druge strane, razina šećera u *asr1* transgeničnom krumpiru je ostala relativno ne promijenjena u listovima (Frankel i sur., 2007).

Navedena razlika između vrsta može se objasniti varijacijama u regulaciji gena. Iako su kodirajuće regije *asr1* gena visoko konzervirane između različitih vrsta roda *Solanum*, njihov odgovor na stres potaknut sušom nije isti što upućuje da su njihove regulatorne regije i/ili regulatorni proteini različiti, odnosno da nisu konzervirani (Frankel i sur., 2006). Navedena razlika se također može vidjeti i u ulozi *asr1* gena u metabolizmu lista. Iako se u listovima *asr1* transgeničnih krumpira ne mijenja razina šećera, u gomoljima *asr1* utišanih krumpira dolazi do povećanja glukoze i fruktoze te povećane razine *ht1* mRNA. Navedene razlike u djelovanju Asr1 proteina, gdje u gomoljima krumpira suprimira ekspresiju transportera heksoze dok u listovima iste vrste nema utjecaja, pokazuje antagonistički efekt na tkiva izvora i izljeva u metabolizmu šećera (Dominguez i Carrari, 2015).

Signalni mehanizmi koji sudjeluju u interakciji između šećera i hormona nisu sasvim razjašnjeni (Eveland i Jackson, 2012), ali je pokazano da produkti porodice gena *asr* sudjeluju u određenoj mjeri u navedenoj interakciji u mnogim biljnim vrstama. Naime, Asr protein u grožđu (MSA) regulira transporter heksoza vezujući se za pojačivač njegovog gena, dok je ekspresija navedenog Asr proteina kontrolirana preko hormona ABA te šećera (Cakir i sur., 2003). Slična uloga *asr1* gena prikazana je i u riži, gdje se količina mRNA *asr1* gena značajno povećava nakon tretmana sa saharozom i hormonom ABA, dok se razina mRNA *asr3* gena povećava nakon tretmana biljke sa saharozom, glukozom te giberelinskom kiselinom (Joo i sur., 2013). U određenim vrstama, interakcija između šećera i hormona je povezana sa dva proteina: heksokinaza 1 te SnRK1 (Snf1 – povezana kinaza) (Eveland i Jackson, 2012). Primjer za navedenu povezanost možemo vidjeti u grožđu gdje je ekspresija *asr1* gena regulirana preko hormona ABA, glukoze, heksokinaze 1 te SnRK1 (Saumonneau i sur., 2012). S druge strane, *asr1* utišane biljke duhana pokazuju povećane količine glukoze u listovima te promijenjene razine hormona ABA te giberelina dok se istovremeno javlja povećana razina mRNA heksokinaze 1 te smanjena razina mRNA SnRK1 (Dominguez i sur., 2013). Navedena povećanja razine glukoze te heksokinaze 1 upućuju na pojačani katabolizam hormona ABA te giberelina, iako je moguće da su drugi signalni putevi uključeni (Dominguez i Carrari, 2015). Hormon ABA, tijekom kasne embriogeneze, promovira ostvarivanje dormancije sjemena te otpornosti na isušivanje, odnosno inhibira klijanje sjemena (Koornneef i sur., 2002).

Asr1 gen je također uključen i u metabolizam aminokiselina u različitim biljnim vrstama i tkivima. Promijene u ekspresiji *asr* gena dovode do promjena u metabolizmu aminokiselina. Naime, kod gomolja krumpira prekomjerna ekspresija te utišavanje *asr1* gena

dovode do smanjene razine različitih aminokiselina (Frankel i sur., 2007). Metabolizam aminokiselina kod rajčice, najvjerojatnije je, pod direktnim utjecajem Asr1 proteina, a nije samo sekundarni efekt povezan sa promjenama u sadržaju šećera. Sličnu povezanost moguće je uočiti kod listova biljke kukuruza gdje su prekomjernom ekspresijom *asr1* gena uočene smanjene razine određenih aminokiselina među kojima su i lančano razgranate aminokiseline (BCAA) kao što su leucin, izoleucin te valin. Promijene u sadržaju navedenih BCAA aminokiselina su popraćene sa promjenama u razini transkripcije njihovih biosintetskih gena te u razini enzima uključenih u te biosintetske putove (Dominguez i Carrari, 2015). U istoj biljci primijećeno je da su razine određenih enzima, koji pripadaju različitim metaboličkim putovima, promijenjene dok su njihove mRNA razine ostale iste (Virlouvet i sur., 2011). Navedenu razliku u količini enzima te pripadne mRNA moguće je objasniti šaperonskim djelovanjem Asr1 proteina na određene enzime.

U odgovoru na stresne uvjete, Asr proteini, uz ranije navedeno djelovanje na regulaciju puči, imaju ulogu i u pročišćivanju stanice od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kroz nekoliko različitih mehanizama (Dominguez i Carrari, 2015). Naime, prekomjerna ekspresija pšeničnog *asr1* gena u duhanu povećava ekspresiju ROS povezanih gena te gena povezanih u odgovoru na stres kada se biljka nalazi pod osmotskim stresom (Hu i sur., 2013). Asr1 protein iz riže može pročistiti ROS-ove (Kim i sur., 2012), dok Asr1 protein iz soje puferira metalne ione te tako pruža antioksidativnu zaštitu stanici (Li i sur., 2013). Kako je već ranije navedeno, promjene u ekspresiji *asr* gena dovode do promjena u razini aminokiselina dok određene aminokiseline, kao što su prolin te lančano razgranate aminokiseline sudjeluju u odgovoru stanice na različite tipove stresa (Obata i Fernie, 2012). Naime, navedeni metaboliti se tokom stresa nakupljaju u određenoj mjeri koja ovisi o tipu i kombinaciji stresa. Smatra se da nakupljanje prolina služi za zaštitu enzima (Serrano i Gaxiola, 1994) te za pročišćivanje slobodnih radikala (Smirnoff i Cumbes, 1989). Kako Asr1 utječe na promjenu u sadržaju aminokiselina, može se zaključiti da Asr1, također sudjeluje u odgovoru na stres regulirajući koncentracije aminokiselina (Dominguez i Carrari, 2015), na primjer smanjujući razinu prolina. Smatra se da je navedena smanjena razina prolina putem Asr1 proteina, rezultat smanjenog staničnog stresa zbog smanjenog unosa natrijevih iona (Kalifa i sur., 2004a). S druge strane, razina saharoze je obično povećana pri većini stresnih uvjeta, dok u određenim *asr1* transgeničnim biljkama, kao što je kukuruz, razina saharoze se smanjuje. To upućuje da je jedan od načina odgovora Asr1 proteina na stresne uvjete preko regulacije količine saharoze (Dominguez i Carrari, 2015). Prekomjerna ekspresija Asr

proteina rezultira u povećanoj ekspresiji drugih gena u fiziološkim uvjetima najvjerojatnije putem svoje DNA vezujuće aktivnosti. Većina tih gena je povezana sa stresom povećanog saliniteta (Kalifa i sur., 2004a). Neki od tih gena kodiraju proteine bogate prolinom kao što je PvSR1 protein iz običnog graha (*Phaseolus vulgaris*) koji ima ulogu u zadržavanju staničnog integriteta tako što stvara jake veze sa staničnom stijenkom (Chai i Zhang, 1999).

4. Buduće biotehnološke primjene

Utjecaj stresnih uvjeta na agronomski važne biljke predstavlja ozbiljan problem na rast i produktivnost navedenih biljaka. Moguća rješenja se mogu pronaći u razumijevanju raznih mehanizama odgovora biljaka na nepovoljne uvjete. U posljednjih 20 godina, proučavanje odgovora biljaka na stresne uvjete, ponajviše sušu, gdje vrlo važnu ulogu imaju Asr proteini, privuklo je pažnju stručnjaka iz područja fiziologije, stanične biologije, biokemije, biofizike, evolucijske biologije, bioinformatike, genomike te biotehnologije (Gonzalez i Iusem, 2014). Mnogo studija je provedeno na heterolognoj ekspresiji *asr* gena u drugim biljkama. Jedno takvo istraživanje je rezultiralo sa biljkom duhana u koju je ugrađena cDNA *asr1* gena iz rajčice pod konstitutivnim promotorom (Kalifa i sur., 2004a). Takva biljka duhana je pokazivala veću otpornost na osmotski stres te manji gubitak vode što upućuje na bolju regulaciju puči. Sličan rezultat je dobiven kada je u biljku duhana ubačen *asr* gen iz pšenice gdje je biljka pokazivala veći sadržaj vode te višu aktivnost enzima katalaze i superoksidne dismutaze što je rezultiralo u većoj otpornosti na nedostatak vode (Hu i sur., 2013). U kukuruzu, konstitutivna prekomjerna ekspresija dodatne kopije njegovog *asr1* gena, dovodi do višeg omjera starenja listova nego u divljem tipu u uvjetima suše (Jeanneau i sur., 2002), dok je nakupljanje Asr1 proteina rezultiralo povećanjem biomase te same dobiti (Virlouvet i sur., 2011). Slični rezultati su dobiveni i za druge ekonomski važne biljke kao što su riža te krumpir. S druge strane, pokazano je da *Asr1* gen iz rajčice kontrolira razinu glukoze te ekspresiju transportera heksoze. Navedena činjenica se može iskoristiti u biotehnološke svrhe jer sadržaj šećera značajno utječe na kvalitetu mnogih, agronomski značajnih vrsta (Dominguez i Carrari., 2015).

5. Zaključak

Članovi porodice gena *asr* imaju važnu ulogu u odgovoru biljaka na stresne uvjete kao što su suša, osmotski stres i slično. Osim u nepovoljnim uvjetima, *asr* geni su eksprimirani i prilikom rasta i razvoja biljaka te za vrijeme dozrijevanja plodova. Asr proteini se u stanici nalaze na dva mjesta: u citoplazmi, kao nestrukturirani proteini gdje mogu obavljati funkciju šaperona te u jezgri, kao uređeni proteini sa kvarternom strukturom gdje mogu obavljati funkciju transkripcijskog faktora. Potonjom ulogom, Asr proteini služe kao regulatori ekspresije drugih gena što je najbolje prikazano na odgovoru biljaka na stresne uvjete gdje Asr proteini povećavaju ekspresiju drugih gena važnih za povećavanje otpornosti biljke.

Asr geni dijele zajedničku osnovnu strukturu od 2 eksona te jednog introna između njih te se razlikuju po njihovoj duljini. Sami proteini također sadrže visoko konzervirane karakteristike kao što je jezgrin lokalizacijski signal na C-kraju proteina te niz histidina na N-kraju koji služi za vezanje na DNA pomoću cinkova kationa.

Asr geni su rasprostranjeni u biljnom carstvu među golosjemenjača i kritosjemenjača, odnosno *asr* gene pronalazimo u jednosupnica i u dvosupnica. U različitim biljkama nalazi se različiti broj *asr* gena te su različito eksprimirani. Tako se u rajčici nalazi 5 članova *asr* gena dok se u riži nalazi 6 članova. Zanimljivo, modelna biljka u raznim istraživanjima, uročnjak, ne sadrži navedene gene. Međusobnim uspoređivanjem *asr* gena te njihovom analizom određeni su filogenetski odnosi Asr proteina iz različitih biljaka te se pretpostavlja starost *asr* porodice gena na 300 milijuna godina.

Jedna od važnijih funkcija *asr* porodice gena jest njihova uloga u odgovoru biljaka na stres. Naime, navedeni geni sudjeluju u povećavanju otpornosti biljke na stresne uvjete regulirajući višestruke biološke procese kao što su fotosinteza, respiracija, metabolizam te prijenos signala.

Od svih gena navedene porodice gena, *asr1* gen je najviše istražen. Dokazano je da ima ulogu u metabolizmu šećera preko ekspresije transportera heksoze. Nadalje, ima ulogu u metabolizmu aminokiselina te sudjeluje u interakciji između šećera i hormona. U stresnim uvjetima, uz ranije navedene funkcije, *asr1* još sudjeluje u pročišćavanju stanice od reaktivnih kisikovih vrsta. Također, u bilo kojem stadiju dozrijevanja plodova, *asr1* gen je glavni eksprimirani gen.

Zbog svoje uloge u povećavanju biljne otpornosti na stresne uvjete te zbog promjena klime u svijetu, danas se sve više istražuju moguće biotehnološke primjene *asr* porodice gena.

Jedan od primjera su i *asr* transgenične biljke koje bi pokazivale bolju otpornost na nepovoljne uvjete, odnosno veći i kvalitetniji prinos.

6. Literatura

- Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P., Bar-Zvi, D. (1995) Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science*, 110(2):205-213.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcíarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A. (2008) The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1): 6-24.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion In Cell Biology*, 12(4):431-434.
- Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R. (2003) A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling. *The Plant Cell Online*, 15(9):2165-2180.
- Canel, C., Bailey-Serres, J., Roose, M. (1995) Pummelo Fruit Transcript Homologous to Ripening-Induced Genes. *Plant Physiology*, 108(3):1323-1324.
- Carpentier, S., Witters, E., Laukens, K., Van Onckelen, H., Swennen, R., Panis, B. (2007) Banana (*Musa spp.*) as a model to study the meristem proteome: Acclimation to osmotic stress. *PROTEOMICS*, 7(1):92-105.
- Chai, T., Zhang, Y. (1999) Gene expression analysis of a proline-rich protein from bean under biotic and abiotic stress. *Acta Botanica Sinica*, 41:111-113.
- Chaves, M. (1991) Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal Of Experimental Botany*, 42(1):1-16.
- Cortés, A., Chavarro, C., Madriñán, S., This, D., Blair, M. (2012) Molecular ecology and selection in the drought-related Asr gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genetics*, 13(1):58.
- Dominguez, P., Carrari, F. (2015) ASR1 transcription factor and its role in metabolism. *Plant Signaling & Behavior*, 10(4):e992751.
- Dominguez, P., Frankel, N., Mazuch, J., Balbo, I., Iusem, N., Fernie, A., Carrari, F. (2013) ASR1 Mediates Glucose-Hormone Cross Talk by Affecting Sugar Trafficking in Tobacco Plants. *Plant Physiology*, 161(3):1486-1500.
- Eveland, A., Jackson, D. (2012) Sugars, signalling, and plant development. *Journal Of Experimental Botany*, 63(9):3367-3377.
- Fischer, I., Camus-Kulandaivelu, L., Allal, F., Stephan, W. (2011) Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the Asr gene family. *New Phytologist*, 190(4):1032-1044.
- Fischer, I., Steige, K., Stephan, W., Mboup, M. (2013) Sequence Evolution and Expression Regulation of Stress-Responsive Genes in Natural Populations of Wild Tomato. *Plos ONE*, 8(10):e78182.

- Frankel, N., Nunes-Nesi, A., Balbo, I., Mazuch, J., Centeno, D., ... Carrari F. (2007) ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Molecular Biology*, 63(5):719-730.
- Frankel, N., Carrari, F., Hasson, E., Iusem, N. (2006) Evolutionary history of the Asr gene family. *Gene*, 378:74-83.
- Frankel, N., Hasson, E., Iusem, N., Rossi, M. (2003) Adaptive Evolution of the Water Stress-Induced Gene Asr2 in Lycopersicon Species Dwelling in Arid Habitats. *Molecular Biology And Evolution*, 20(12):1955-1962.
- Giombini, M., Frankel, N., Iusem, N., Hasson, E. (2008) Nucleotide polymorphism in the drought responsive gene Asr2 in wild populations of tomato. *Genetica*, 136(1):13-25.
- Golan, I., Dominguez, P., Konrad, Z., Shkolnik-Inbar, D., Carrari, F., Bar-Zvi, D. (2014) Tomato ABSCISIC ACID STRESS RIPENING (ASR) Gene Family Revisited. *Plos ONE*, 9(10):e107117.
- González, R., Iusem, N. (2014). Twenty years of research on Asr (ABA-stress-ripening) genes and proteins. *Planta*, 239(5):941-949.
- Henry, I., Carpentier, S., Pampurova, S., Van Hoylandt, A., Panis, B., Swennen, R., Remy, S. (2011). Structure and regulation of the Asr gene family in banana. *Planta*, 234(4):785-798.
- Hsu, Y., Yu, S., Yang, C., Wang, C. (2011) Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology And Biochemistry*, 49(9):937-945.
- Hu, W., Huang, C., Deng, X., Zhou, S., Chen, L., Li, Y., ... He, G. (2013) TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 36(8):1449-1464.
- Huang, J., Lin, S., Wang, C. (2000) A Pollen-Specific and Desiccation-Associated Transcript in Lilium longiflorum during Development and Stress. *Plant And Cell Physiology*, 41(4):477-485.
- Iusem, N., Bartholomew, D., Hitz, W., Scolnik, P. (1993) Tomato (Lycopersicon esculentum) Transcript Induced by Water Deficit and Ripening. *Plant Physiology*, 102(4):1353-1354.
- Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Zivy, M., Vidal, J., Toppan, A., Perez, P. (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*, 84(11):1127-1135.
- Joo, J., Lee, Y., Kim, Y., Nahm, B., Song, S. (2013) Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. *Molecules And Cells*, 35(5):421-435.
- Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P., Bar-Zvi, D. (2004a) Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell And Environment*, 27(12):1459-1468.

- Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccari, M., Scolnik, P., Bar-Zvi, D. (2004b) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal*, 381(2):373-378.
- Kermode, A. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews In Plant Sciences*, 9(2):155-195.
- Koornneef, M., Bentsink, L., Hilhorst, H. (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion In Plant Biology*, 5(1):33-36.
- Lescot, M., Piffanelli, P., Ciampi, A., Ruiz, M., Blanc, G., ... Town, C. D. (2008) Insights into the *Musa* genome: syntenic relationships to rice and between *Musa* species. *BMC Genomics*, 9(1):58.
- Li, R., Liu, G., Wang, H., Zheng, Y. (2013) Effects of Fe^{3+} and Zn^{2+} on the Structural and Thermodynamic Properties of a Soybean ASR Protein. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 77(3):475-481.
- Maskin, L., Maldonado, S., Iusem, N. (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Molecular Biology Reports*, 35(4):501-505.
- Meyer, P. (1995) Understanding and controlling transgene expression. *Trends In Biotechnology*, 13(9):332-337.
- Obata, T., Fernie, A. (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 69(19):3225-3243.
- Ohta, T. (1989) Role of gene duplication in evolution. *Genome*, 31(1):304-310.
- Philippe, R., Courtois, B., McNally, K., Mournet, P., El-Malki, R., ... This, D. (2010) Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theoretical And Applied Genetics*, 121(4):769-787.
- Ricardi, M., González, R., Zhong, S., Domínguez, P., Duffy, T., ... Iusem N. D. (2014) Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC Plant Biology*, 14(1):29.
- Ricardi, M., Guaimas, F., González, R., Burrieza, H., López-Fernández, M., ... Iusem, N. (2012) Nuclear Import and Dimerization of Tomato ASR1, a Water Stress-Inducible Protein Exclusive to Plants. *Plos ONE*, 7(8):e41008.
- Rossi, M., Lijavetzky, D., Bernacchi, D., Hopp, H. E., Iusem, N. (1996) *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato. *MGG Molecular & General Genetics*, 252(4):489-492.
- Rossi, M., Iusem, N. (1994) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Genomic Clone Homologous to a Gene Encoding an Absciscic Acid-Induced Protein. *Plant Physiology*, 104(3):1073-1074.

- Saumonneau, A., Laloi, M., Lallemand, M., Rabot, A., Atanassova, R. (2012) Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. *Journal Of Experimental Botany*, 63(3):1495-1510.
- Schneider, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (1997) Expression Patterns and Promoter Activity of the Cold-Regulated Gene ci21A of Potato. *Plant Physiology*, 113(2):335-345.
- Serrano, R., Gaxiola, R. (1994) Microbial Models and Salt Stress Tolerance in Plants. *Critical Reviews In Plant Sciences*, 13(2):121-138.
- Slewinski, T. (2011) Diverse Functional Roles of Monosaccharide Transporters and their Homologs in Vascular Plants: A Physiological Perspective. *Molecular Plant*, 4(4):641-662.
- Smart, L., Cameron, K., Bennett, A. (2000) Isolation of genes predominantly expressed in guard cells and epidermal cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology*, 42(6):857-869.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4):1057-1060.
- Sreedharan, S., Shekhawat, U., Ganapathi, T. (2013) Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnology Journal*, 11(8):942-952.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., Thomas, G. (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science*, 140(1):21-30.
- Vignault, C., Vachaud, M., Cakir, B., Glissant, D., Dedaldechamp, F., ... Delrot, S. (2005) VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal Of Experimental Botany*, 56(415):1409-1418.
- Virlouvet, L., Jacquemot, M., Gerentes, D., Corti, H., Bouton, S., ... Coursol S. (2011) The ZmASR1 Protein Influences Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis and Maintains Kernel Yield in Maize under Water-Limited Conditions. *Plant Physiology*, 157(2):917-936.
- Wang, H., Hsu, C., Jauh, G., Wang, C. (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia Plantarum*, 123(3):314-320.
- Wang, C., Liau, Y., Huang, J., Wu, T., Su, C., Lin, C. (1998) Characterization of a Desiccation-Related Protein in Lily Pollen during Development and Stress. *Plant And Cell Physiology*, 39(12):1307-1314.
- Yang, C., Chen, Y., Jauh, G., Wang, C. (2005) A Lily ASR Protein Involves Abscisic Acid Signaling and Confers Drought and Salt Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(2):836-846.
- Zhang, L., Hu, W., Wang, Y., Feng, R., Zhang, Y., Liu, J., ... Jin, Z. (2014) The MaASR gene as a crucial component in multiple drought stress response pathways in *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2):247-260.

7. Sažetak

Članovi porodice gena *asr* rasprostranjeni su po dijelu biljnog carstva te ih ne pronalazimo izvan njega. Oni dijele zajedničku strukturu od dva eksona te jednog introna. Dualnom lokalizacijom u citosolu te jezgri, Asr proteini djeluju kao šaperoni te transkripcijski faktori. Ulogu Asr proteina možemo vidjeti tokom rasta i razvoja biljaka, prilikom dozrijevanja plodova, ali i prilikom odgovora biljke na različite nepovoljne uvjete. Asr proteini služe kao regulatori ekspresije gena što je najbolje prikazano upravo u odgovoru biljaka na stresne uvjete. Ovi proteini povećavaju ekspresiju drugih gena važnih za povećanje otpornosti biljke regulirajući time višestruke biološke procese.

Prvotno otkriće kodirajuće sekvence Asr proteina u rajčici potaknulo je mnoga istraživanja navedenih proteina u raznim vrstama sa stajališta raznih znanstvenih područja kao što je biokemija, stanična biologija, evolucija, fiziologija, epigenetika te u novije vrijeme i biotehnologija. Istraživanje mehanizama obrane biljaka u različitim abiotičkim stresnim uvjetima je vrlo važno za razumijevanje pozadinskih signalnih putova, ali i za unaprjeđenje genetskih modifikacija agronomski važnih biljaka.

8. Summary

Members of *asr* gene family are spread through a part of the plant kingdom and are not found outside it. They share a common structure of two exons and one intron. Asr proteins act as chaperones and as transcriptional factors due to their localization in cytosol and in nucleus. The role of Asr proteins can be seen during growth and development of plants, fruit ripening, and plant response to different abiotic stresses. Asr proteins act as regulators of gene expression, which is best shown in the plant response to stress conditions. These proteins increase the expression of other genes important for increasing plant resistance, thereby regulating multiple biological processes.

The original finding of the coding sequence of tomato Asr protein initiated many research projects of these proteins in different species from research groups spanning multiple fields such as biochemistry, cell biology, evolution, physiology, epigenetics and in recent time, biotechnology. Investigating plants defense mechanisms in different abiotic stresses is very important for both understanding the underlying signaling pathways and improving genetic modifications agronomically important crops.