

## Karakterisasi gen ketahanan terhadap suhu tinggi *HSP70* pada anggrek *Vanda tricolor* var. *suavis* forma Merapi

### Characterization of *High Temperature Resistance gene (HSP70)* of *Vanda tricolor* var. *suavis* forma Merapi orchids

ENDANG SEMIARTI<sup>1</sup>, ROZIKIN

Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281, Tel./fax. +62-274-580839, <sup>1</sup>email: endsemi@ugm.ac.id

Manuskrip diterima: 19 Februari 2015. Revisi disetujui: 19 April 2015.

**Abstrak.** Semiarti E, Rozikin. 2015. Karakterisasi gen ketahanan terhadap suhu tinggi *HSP70* pada anggrek *Vanda tricolor* var. *suavis* forma Merapi. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1*: 404-408. *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Merapi merupakan anggrek lokal Indonesia yang banyak tumbuh di lereng Gunung Merapi dan menjadi maskot Provinsi DIY. Kemampuan *V. tricolor* untuk bertahan hidup di lereng Merapi yang sering dilanda awan panas (*pyroclastic flows*) saat terjadi letusan gunung berapi yang sangat aktif tersebut menunjukkan ketahanan terhadap suhu tinggi, yang kemungkinan disebabkan adanya peran *Heat Shock Protein (HSP)* sebagai molekul *chaperon*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi gen *HSP70* pada *V. tricolor* forma Merapi. Metode penelitian dilakukan dengan mengisolasi *HSP70* cDNA dari pustaka cDNA daun *V. tricolor* forma Merapi umur 2 tahun menggunakan 2 set *degenerate primers HSP70F1R1* dan *HSP70F2R2*, menghasilkan *HSP70*cDNA sekitar 600 bp. Hasil amplifikasi cDNA disekuon, kemudian dianalisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, BioEdit dan analisis pohon filogenetik dengan MEGA5 dan motif protein dianalisis menggunakan *software online MOTIF Search* (<http://www.genome.jp/tools/motif/>). Hasil penelitian menunjukkan telah teramplifikasi *HSP70*cDNA dengan primer *HSP70F1R1* dan *HSP70F2R2*, masing-masing dengan panjang 600 bp dan 680 bp. Allignment cDNA hasil PCR menghasilkan cDNA dengan panjang 1212 bp. Analisis filogenetik berdasarkan sekuon asam amino *HSP70*cDNA menunjukkan adanya kemiripan dengan *HSP70* organisme lain sebesar 82-85% di antaranya dengan tanaman *Zea mays* (82%), *Dendrobium officinale* (84%), *Arabidopsis lyrata* (84%) dan *Malus domestica* (85%). Pada *HSP70 V. tricolor* terdapat domain yang *conserve* untuk semua jenis *HSP* yaitu *Nucleotide binding site sugar-kinase HSP70 actin superfamily* pada asam amino urutan 1-400, *Pox Ag35 superfamily* pada asam amino urutan 750-110 serta *NAD-GH* pada asam amino 250-800. Ketiga domain ini dimiliki oleh protein *HSP70* dengan berbagai variasinya. *HSP70 V. tricolor* pada asam amino 96-110 memiliki urutan sekuon dengan pola spesifik *HSP70* yaitu [LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-{LS}-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA]. Analisis filogeni yang dilakukan dengan membandingkan protein *HSP70 V. tricolor* dengan protein *HSP70* organisme lain menunjukkan bahwa *V. tricolor* memiliki asam amino spesifik yang menjadi penciri protein *HSP70 V. tricolor* sehingga mampu bertahan di habitat dengan suhu tinggi.

**Kata kunci:** *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* forma Merapi, ketahanan suhu tinggi, Gunung Merapi, *HSP70*, cDNA

**Abstract.** Semiarti E, Rozikin. 2015. Characterization of *High Temperature Resistance gene (HSP70)* of *Vanda tricolor* var. *suavis* forma Merapi orchids. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1*: 404-408. *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Forma Merapi is an Indonesian local orchid that grows on the slopes of Mount Merapi and became the mascot of Province of Special Territory of Yogyakarta. The ability to survive on the slopes of Merapi, which is often hit by pyroclastic flows when volcano eruption occurs show the resistance to high temperatures, which is probably caused by the role of *Heat Shock Protein (HSP)* as molecular chaperones. The aim of this study was to isolate and characterize the *HSP70* gene in *V. tricolor* Forma Merapi. The methods of research conducted by isolating *HSP70* cDNA from cDNA library of *V. tricolor* leaves, 2 years of age, using two sets of degenerate primers *HSP70F1R1* and *HSP70F2R2*, that generating approximately 600 bp *HSP70*cDNA. The amplified cDNAs were sequenced and analyzed by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Bioedit and analyzed for a phylogenetic tree with MEGA5 and analyzed for protein motifs using online software MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>). The results showed that *HSP70*cDNA were amplified using *HSP70F1R1* and *HSP70F2R2* with lengths of 600 bp and 680 bp, respectively. The sequence alignment of PCR products generates cDNA with a length of 1212 bp. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequence similarity with *HSP70*cDNA of other organisms showed 82-85% sequence identities, including *Zea mays* (82%), *Dendrobium officinale* (84%), *Arabidopsis lyrata* (84%) and *Malus domestica* (85%). In *HSP70 V. tricolor* there are conserved domains for all types of HSP, i.e sugar - nucleotide binding site actin *HSP70* kinase superfamily in the a.a sequence 1-400, Pox Ag35 superfamily at a.a sequences 750-110 and NAD - GH a.a 250- 800. The third domain is common for *HSP70* proteins with several variations. *V. tricolor HSP70* having a sequence with the sequence-specific pattern of *HSP70* is [LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-{LS}-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA] at a.a sequences 96-110. Phylogenetic analysis by comparing protein *HSP70 V. tricolor* with protein *HSP70* from other organisms showed that *V. tricolor* has a specific amino acid that is a characteristic protein of *HSP70 V. tricolor*, which might support the plant to survive in a habitat with high temperatures.

**Keywords:** *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* forma Merapi, high temperature resistance, Mount Merapi, *HSP70*, cDNA

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan sumber plasma nutfah anggrek terbesar di dunia. Dari sekitar 30.000 spesies anggrek di dunia, Indonesia memiliki sekitar 5000 spesies (Irawati 2002). Potensi tersebut dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kualitas anggrek lokal Indonesia. Salah satu di antaranya adalah *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* yang banyak tumbuh di lereng G. Merapi. Anggrek *V. tricolor* memiliki bunga yang indah berwarna dasar putih, dengan pola totol-totol berwarna ungu kecokelatan pada sepal dan petalnya dan labellum berwarna ungu bergradasi merah sampai merah muda, serta berbau harum (Gambar 1A dan 1B). Buahnya mengandung biji yang jumlahnya jutaan, sehingga menjadi nilai positif dari anggrek *V. tricolor* ini, terutama untuk konservasi anggrek alam yang habitat alamnya adalah di gunung berapi yang sangat aktif yaitu G. Merapi. Ukuran biji *V. tricolor* sangat kecil bahkan mikroskopis, tidak mempunyai endosperm sebagai cadangan makanan, sehingga di alam keberhasilan perkecambahan bijinya sangat rendah karena harus bersimbiosis dengan sejenis jamur yang disebut mikroriza. Oleh karena itu untuk konservasi sumber daya hayati anggrek *V. tricolor* ini umumnya dilakukan dengan mengecambahkan bijinya secara *in vitro* di laboratorium dengan medium buatan (Semiarti et al. 2009). Tanaman anggrek *V. tricolor* banyak digunakan sebagai induk silangan karena habitusnya yang kokoh dan bunganya yang menarik, selain itu tanaman ini juga mempunyai range suhu udara yang sangat luas, dapat tumbuh di dataran rendah sampai dataran tinggi, dan mampu bersifat sangat toleran terhadap suhu tinggi, mampu hidup dengan baik pada kondisi terpapar sinar matahari dan awan panas yang secara fluktuatif sering keluar dari kubah G. Merapi. Hal ini menimbulkan suatu pertanyaan apakah *V. tricolor* yang menjadi ikon G. Merapi ini mempunyai gen *Heat Shock Protein* yang sangat kuat merespons cekaman suhu lingkungan di tempat tumbuhnya dengan suhu yang ekstrem tinggi?

Cekaman suhu lingkungan yang panas terhadap tanaman umumnya akan direspons oleh tanaman secara fisiologis, biokimiawi dan molekular supaya tanaman tetap dapat bertahan hidup. Secara molekular, adanya cekaman panas akan mengaktivasi *Heat Stress Response (HSR)* yang akan memacu gen *Heat Shock Protein (HSP) Family* sebagai Chaperones (molekul yang bertugas menjaga homeostatis dalam sel) (Feder and Hofmann 1999; Scharf et al. 2011).

Pada tanaman, berdasarkan berat molekulnya terdapat 5 grup HSP: (i) HSP100, (ii) HSP90, (iii) *HSP70*, (iv) HSP60 and (v) *small heat-shock proteins* (sHSPs) (Al-Whaibi 2011). Sampai saat ini, telah banyak penelitian tentang HSP tersebut pada berbagai tanaman, baik pada tanaman dikotil maupun monokotil, terutama HSP60, *HSP70* dan HSP90. Tetapi pada tanaman anggrek belum banyak diteliti, sehingga informasi mengenai gen ketahanan panas pada anggrek sangat kurang, padahal anggrek sebagian besar hidup di daerah tropis.

Di tempat dengan suhu lingkungan yang ekstrem panas seperti anggrek litofit maupun epifit terus menerus terpapar sinar matahari secara langsung. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen ketahanan panas pada plantlet *in vitro* tanaman anggrek *V. tricolor* var. *suavis* yang berasal dari (Forma) G. Merapi. Strategi yang dilakukan adalah menganalisis homologi gen ketahanan panas pada berbagai tanaman terutama tanaman monokotil dengan referensi sekuen dari gen bank, kemudian dibuat primer *degenerate* untuk mengisolasi cDNA *HSP70* dari plantlet anggrek *V. tricolor* umur 2 tahun (Gambar 1E dan 1F), kemudian menganalisis sekuen cDNA hasil PCR untuk mengetahui struktur cDNA *HSP70* pada *V. tricolor* var. *suavis* forma Merapi. Dengan diketahuinya cDNA *HSP70* diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut terutama penelitian bioteknologi untuk meningkatkan toleransi berbagai tanaman terhadap cekaman suhu tinggi.

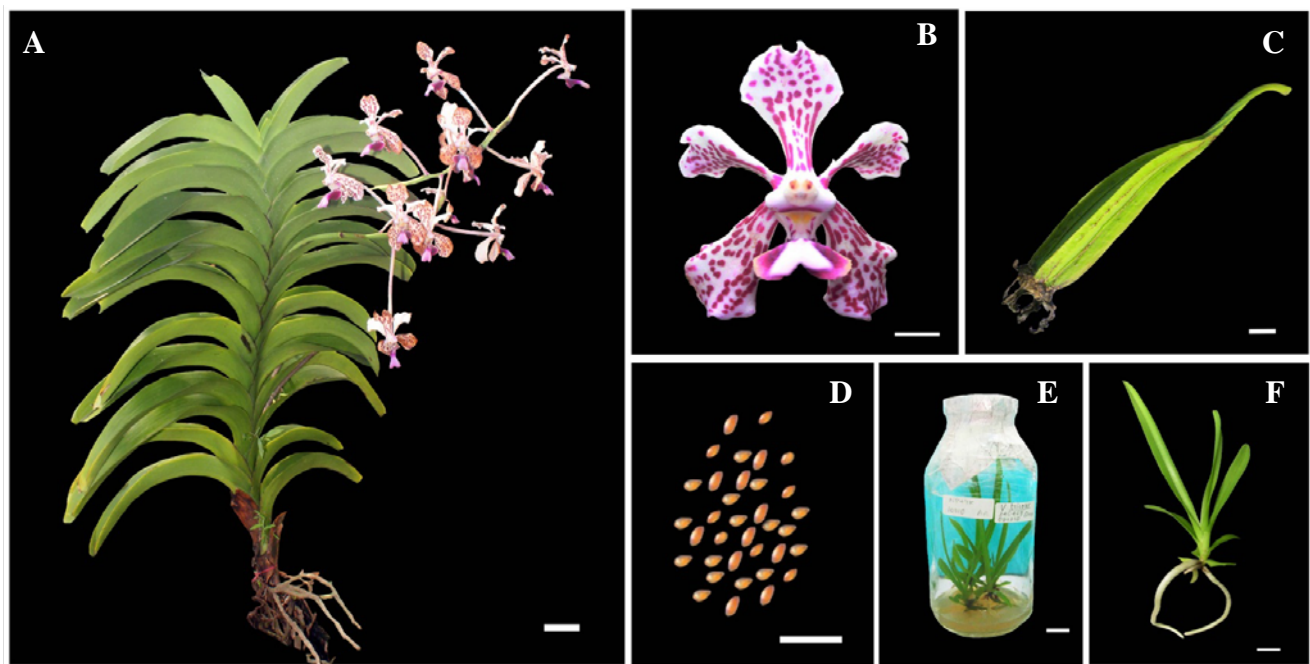
## BAHAN DAN METODE

### Bahan tanaman

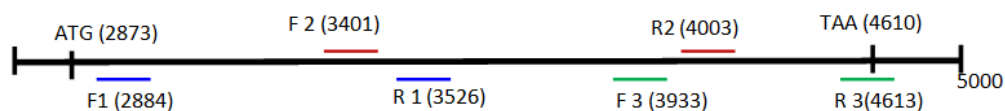
Bahan tanaman yang digunakan berupa tanaman hasil perkecambahan *in vitro/plantlet* anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Merapi yang diambil dari lereng selatan G. Merapi. *Plantlet* anggrek umur 2 tahun ditanam pada medium *New Phalaenopsis* (NP; Islam et al. 1998). Kultur diinkubasi di bawah cahaya putih 1000 lux secara kontinyu pada temperatur 25°C. (Gambar 1E).

### Isolasi total RNA dan Amplifikasi cDNA *HSP70*

Isolasi total RNA tanaman dilakukan dari 0.1 g daun tanaman anggrek menggunakan *Qiagen RNeasy mini kit* (*Qiagen GmbH, Germany*). Total RNA dicek dengan 0,7% Agarose elektroforesis dan divisualisasi dengan UV transiluminator, konsentrasi RNA dicek dengan spektrofotometri. Populasi cDNA disintesis dari total RNA dengan menggunakan iScript RT Supermix (*Biorad, UK*), selanjutnya populasi cDNA tersebut digunakan sebagai *template* untuk mengisolasi cDNA gen *HSP70* dengan PCR menggunakan pasangan *Degenerate primer HSP70* di 3 titik pada lokus gen *HSP70* berbagai tanaman diberi nama Deg*HSP70*F1 (5'-TSATYGGYAGGAGGTTYWS), Deg-*HSP70*RI (5'-ATCTCAATSGTGGTC-TGSG), Deg*HSP70*F2 (5'-SCARGARTTCAAGMGSAAAG), Deg*HSP70*R2 (5'-TAVACCTGGATSAGSACRC), dan Deg*HSP70*F3 (5'-ATYCCSACCAAGAAGGAG), Deg*HSP70*R3 (5'-MGY TTAGTCSACCTCCTC) yang telah didesain berdasarkan homologi sekuen gen *HSP70* beberapa tanaman dari referensi *Gene Bank* (Gambar 2), dianalisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan konsensus sekuennya dianalisis dengan Clustal-X. Untuk kontrol internal dilakukan PCR untuk mengamplifikasi gen Actin (400 bp) dan  $\alpha$ -Tubulin (1200 bp). Produk PCR dianalisis dengan 0,7% gel elektroforesis dan divisualisasi dengan pewarna DNA *Goodview*. Fragmen cDNA hasil amplifikasi selanjutnya disekuen. Sekuen dianalisis dengan BLAST dan Clustal X untuk karakterisasi struktur cDNA *HSP70*.



**Gambar 1.** Morfologi tanaman *V. tricolor* Lindl. var *suavis* forma Merapi. A. Habitus tanaman umur 5 tahun; B. Bunga; C. Buah; D. Biji; E. *Plantlet* dalam botol; F. *Plantlet* umur 2 tahun dari dalam botol siap ditanam di pot. Skala: 5 cm pada A.



**Gambar 2.** Peta desain primer F1R1, F2R2, dan F3R3 pada lokus gen *HSP70* tanaman berdasarkan sekuen dari *Gene Bank*

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Homologi gen *HSP70* pada tanaman monokotil

Hasil amplifikasi cDNA *HSP70* *V. tricolor* dengan degenerate primers *HSP70* F2R2 dan F3R3 menghasilkan fragmen DNA tunggal, masing-masing 600 bp dan 680 bp, meskipun primer F1R1 menghasilkan beberapa fragmen/pita DNA (Gambar 3). Kemungkinan perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk mengamplifikasi fragmen target sepanjang 600 bp. Primer didesain berdasarkan sekuen HSP tanaman monokotil yang tersedia di *gene bank*. Amplifikasi dengan dua set *degenerate primer* yang saling *overlap* pada *Vanda tricolor* berukuran 1212 bp sesuai dengan hasil sekuen nukleotida fragmen DNA hasil PCR yang diperoleh.

Hasil analisis sekuen hasil PCR dengan *BLAST HSP70* *Vanda tricolor* memiliki kemiripan yang tinggi dengan beberapa tanaman di antaranya *Zea mays* (82%), *Dendrobium officinale* (84%), *Arabidopsis lyrata* (84%) dan *Malus domestica* (85%), selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

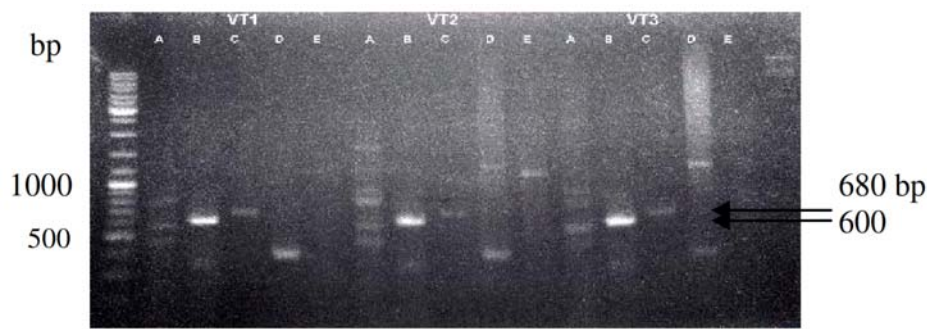
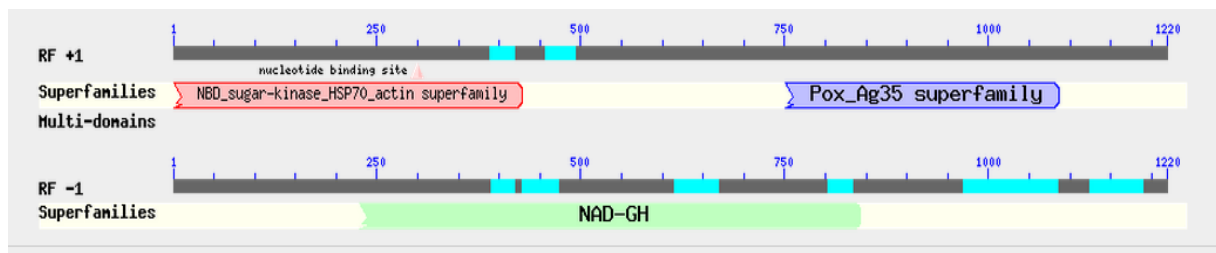
Analisis lebih lanjut pada sekuen asam amino *HSP70* *V. tricolor* menunjukkan protein ini memiliki tiga domain,

serta sekuen pencari khusus untuk HSP family. Tiga domain tersebut adalah *Nucleotide binding site sugar-kinase HSP70 actin superfamily* pada asam amino urutan 1-400, *Pox Ag35 superfamily* pada asam amino urutan 750-110 serta *NAD-GH* pada asam amino 250-800 (Gambar 4). Ketiga domain ini umumnya dimiliki oleh protein *HSP70*, meskipun sekuennya bervariasi. Variasi pada daerah ini diduga mempengaruhi kinerja protein *HSP70*. Perbedaan ini diduga merupakan bentuk adaptasi terhadap lingkungan tempat hidup organisme tersebut (Vásquez-Robinet et al. 2010).

Selain domain yang memiliki variasi, pada sekuen asam amino protein *HSP70* *V. tricolor* juga terdapat sekuen pencari protein *HSP70*. Urutan sekuen ini dimiliki oleh semua protein HSP dengan urutan dan pola yang sama dan tidak terdapat pada protein lain. Sehingga pola ini menjadi identitas protein *HSP70*. Pola spesifik ini adalah [LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-{LS}-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA] (Larkindale et al. 2005). Dengan menggunakan *software online* MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) diketahui bahwa *HSP70* *V. tricolor* memiliki urutan sekuen ini pada asam amino 96-110.

**Tabel 1.** Analisis BLAST terhadap sekuen protein *HSP70 V. tricolor*

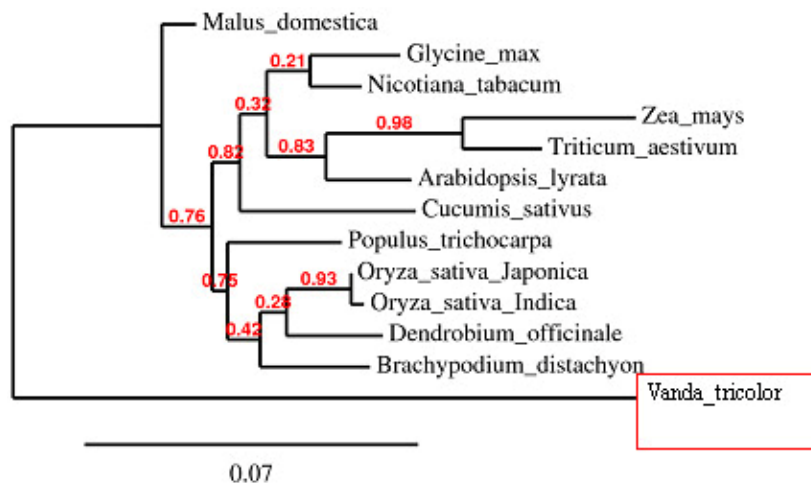
Deskripsi	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Brachypodium distachyon</i>	658	658	98%	0.0	83%	XP_003578898.1
<i>Zea mays</i>	665	665	98%	0.0	82%	DAA44672.1
<i>Populus trichocarpa</i>	666	666	98%	0.0	83%	XP_002332588.1
<i>Dendrobium officinale</i>	667	667	98%	0.0	84%	AGR45355.1
<i>Cucumis sativus</i>	667	667	98%	0.0	83%	XP_004142749.1
<i>Glycine max</i>	670	670	98%	0.0	84%	XP_003552692.1
<i>Oryza sativa</i> Indica Group	671	671	98%	0.0	84%	CAA47948.2
<i>Triticum aestivum</i>	672	672	98%	0.0	84%	AEO22185.1
<i>Malus domestica</i>	673	673	98%	0.0	85%	AAF34134.1
<i>Malus hupehensis</i>	674	674	98%	0.0	85%	ADZ46371.1
<i>Oryza sativa</i> Japonica	676	676	98%	0.0	84%	ABG22609.1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	676	676	98%	0.0	84%	XP_002884912.1
<i>Populus trichocarpa</i>	678	678	98%	0.0	85%	XP_002311161.

**Gambar 3.** Hasil Amplifikasi cDNA tanaman *V. tricolor* var *suavis* forma Merapi dengan *degenerate* primer *HSP70*. Lajur 1: marka DNA, VT #1-#3 tanaman *V. tricolor* yang dianalisis cDNA-nya dengan primer *HSP70* F1R1 (A), *HSP70* F2R2 (B), *HSP70* F3R3 (B). Sebagai kontrol cDNA juga diamplifikasi dengan primer Actin (D) dan primer  $\alpha$ -Tubulin (E). Tampak bahwa cDNA *HSP70* terdeteksi pada tanaman *V. tricolor* umur 2 tahun, terutama dengan primer *HSP70* F2R2.**Gambar 4.** Struktur Protein *HSP70* pada *Vanda tricolor* forma Merapi

Analisis filogeni protein *HSP70 V. tricolor* terhadap protein *HSP70* organisme lain yang memiliki kemiripan tinggi menunjukkan *V. tricolor* memiliki protein *HSP70* yang sangat spesifik dan berbeda dengan protein *HSP70* organisme lain. Pada pohon filogeni terlihat bahwa protein *HSP70 V. tricolor* terpisah dari kluster *HSP70* dari tanaman yang lain (Gambar 5).

*Vanda tricolor* forma Merapi memiliki sekuen *HSP70* yang khas. Dengan habitat yang berbeda, hal ini sangat mungkin terjadi. Berbeda habitat berbeda pula cekaman stres yang dihadapi (Su and Li 2008). Sekuen ini mungkin

merupakan sekuen *HSP70* khas untuk anggrek atau tanaman lain yang hidup di habitat gunung berapi dengan suhu yang tinggi. *HSP70* pada *V. tricolor* kemungkinan menjadi salah satu alasan mengapa *V. tricolor* ini mampu bertahan setelah erupsi Gunung Merapi tahun 2010. Seperti yang dilaporkan oleh Al-Whaibi (2011), bahwa pada tumbuhan tinggi terdapat paling sedikit 20-40 macam HSP protein dengan berat molekul kecil yang saling berkoordinasi untuk beradaptasi toleran terhadap stres panas (pemicuan, pemeliharaan dan pengembalian). Protein HSP berfungsi sebagai molekul chaperon yang



**Gambar 5.** Pohon filogeni kekerabatan *HSP70* pada tanaman. *HSP70* pada *V. tricolor* terpisah sebagai kluster yang berbeda dengan *HSP70* tanaman lain

dapat membantu mengatasi kesalahan pelipatan (*misfolding*) dan agregasi protein sehingga kemungkinan menyebabkan *V. tricolor* mampu bertahan pada suhu udara yang tinggi. Kemampuan protein *HSP70* *V. tricolor* yang unik ini dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan di masa mendatang, di antaranya dengan menyisipkan gen ini ke genom tanaman lain untuk membuat tanaman transgenik yang tahan panas. Selain *HSP70*, perlu diteliti pula apakah *V. tricolor* juga memiliki *HSP60*, *HSP90* atau *HSP100* yang kemungkinan secara terpisah atau bersama-sama berperan dalam mekanisme toleransi tanaman terhadap suhu tinggi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Hj. Sri Suprih Lestari pemilik Titi Orchids Nursery, Pakem, Sleman, pelestari anggrek *V. tricolor* di lereng selatan Merapi atas pemberian tanaman induk anggrek *V. tricolor*. Penelitian ini didanai BOPTN T.A. 2013 Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta dengan Hibah Penelitian Biodiversitas Tropika Dosen untuk Pengembangan Pembelajaran dengan SK. No. UGM/BI/2408/UM/01/39.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Al-Wahaibi MH. 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review. *J King Saud Univ Sci* 23 (2): 139-150.
- Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 243-282.
- Gardiner LM. 2007. *Vanda tricolor* Lindl. conservation in Java: Genetic and geographic structure and history. *Lankesteriana* 7 (1-2): 272-280.
- Irawati. 2002. Konservasi Anggrek Spesies di Indonesia. Prosiding Seminar Anggrek Indonesia, Yogyakarta, 20 Oktober 2002.
- Islam MO, Ichihashi, Matsui S. 1998. Control of growth and development of Protocorm Like-Body derived from callus by Carau Source in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnol* 15 (4): 183-187.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138: 882-897.
- Scharf KD, Hahn A, Bublak D, Schleiff E. 2011. Crosstalk between *Hsp90* and *HSP70* chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *The Plant Cell* 23: 741-755
- Semiarti E, Dewi K, Sasongko AB, Nurwulan R. 2009. Bibit GAMA Anggrek Unggulan Hasil Persilangan Anggrek Lokal Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Merapi dan *Vanda limbata* Blume dengan karakter molekular. UGM, Yogyakarta.
- Su P-H, Li H-M. 2008. *Arabidopsis* stromal 70-kD Heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol* 146: 1231-1241.
- Vásquez-Robinet J, Watkinson I, Allan AS, Naren R, Lenwood SH, Ruth G. 2010. Differential expression of heat shock protein genes in preconditioning for photosynthetic acclimation in water-stressed loblolly pine. *Plant Physiol Biochem* 48: 256-264.