



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Leśny i Technologii Drewna

Joanna Kopaczyk

**Biochemiczne i molekularne podstawy procesu
ksylogenezy w siewkach sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L.
w warunkach deficytu wody**

*Biochemical and molecular basis of xylogenesis
in *Pinus sylvestris* L. seedlings
under drought conditions*



Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie nauki leśne
Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences in the discipline of forestry

Promotor:

prof. dr hab. Tomasz Jelonek

Katedra Użytkowania Lasu

Wydział Leśny i Technologii Drewna

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Promotor pomocniczy:

dr Elżbieta Dziabaszewska

GPSK Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Poznań 2026

.....

imię i nazwisko promotora / promotorów / promotora pomocniczego

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.:

.....

.

.....

. została przygotowana pod moim/naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora rozprawy

.....

Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy

.....

.....

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.:

.....

.....

..... napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data

.....

podpis autora rozprawy

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam moim Promotorom, prof. dr hab. Tomaszowi Jelonkowi oraz dr Elżbiecie Dziabaszewskiej za opiekę naukową, cenne wskazówki, poświęcony czas oraz wsparcie na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję także pracownikom Zakładu Ekofizjologii Roślin na Wydziale Biologii UAM za pomoc okazaną na początkowym etapie prowadzenia badań.

Szczególne słowa uznania kieruję do pracowników Pracowni Cytogenetyki oraz Zakładu Patomorfologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu — bez ich życzliwości i gotowości do pomocy nie byłoby możliwe dokończenie moich badań. Dziękuję za udostępnienie laboratorium oraz niezbędnej aparatury badawczej.

Osobne podziękowania należą się prof. Jackowi Kubickiemu z Wydziału Fizyki i Astronomii UAM za pomoc w opracowaniu analiz statystycznych oraz cenne konsultacje merytoryczne.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	9
1.1. Ogólny przebieg procesu ksylogenezy	10
1.1.1 Etap I	11
1.1.2 Etap II	11
1.2. Genetyczne podstawy procesu ksylogenezy	13
1.3. Biosynteza ścian komórkowych	16
1.3.1 Celuloza	16
1.3.2 Hemicelulozy	18
1.3.3 Substancje pektynowe	19
1.3.4 Ligniny	20
1.3.5 Białka	22
1.3.6 Rola peroksydaz w procesie wzrostu ścian komórkowych	23
1.3.7 Rola nadtlenu wodoru w procesie wzrostu ścian komórkowych	24
1.4. Czynniki wpływające na przebieg procesu ksylogenezy	24
1.4.1 Gatunek i odmiana	25
1.4.2 Hormony roślinne	25
1.4.3 Warunki środowiska naturalnego i sezonowość	26
1.4.4 Czynniki stresowe	27
1.4.4.1 Stres suszy	29
1.4.4.2 Stres oksydacyjny	33
1.4.4.3 Peroksydazy a warunki stresowe	34
1.4.4.4 Anionorodnik ponadtlenkowy	35
1.4.4.5 Nadtlenek wodoru	36
1.4.5. Odporność na warunki stresu odwodnienia a produktywność drzewostanu	38
2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	40
3. MATERIAŁ I METODY	41
3.1 Materiał roślinny	41
3.2 Schemat doświadczenia	42
3.3 Zbieranie materiału	43
3.4 Przygotowanie preparatów do obserwacji mikroskopowych	43
3.5 Obliczanie względnej zawartości wody (RWC [%])	44
3.6 Pomiar poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym - TBARS	46
3.7 Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet -}$ w reakcji z NBT	48

3.8	Pomiar poziomu nadtlenku wodoru H_2O_2	50
3.9	Izolacja RNA	53
3.10	Usuwanie DNA i odwrotna transkrypcja	55
3.11	Real-Time qPCR	56
3.12	Analiza statystyczna	58
4.	WYNIKI.....	59
4.1	Zmiany morfologiczne siewek pod wpływem odwodnienia.....	59
4.2	Obserwacje mikroskopowe – celuloza i lignina	62
4.3	Względna zawartość wody (RWC [%])	69
4.4	Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) – marker peroksydacji lipidów.....	72
4.5	Poziom anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ w reakcji z NBT	73
4.6	Poziom nadtlenku wodoru H_2O_2	75
4.7	Badanie ekspresji genów metodą Real-Time RT-PCR	77
5.	DYSKUSJA.....	80
6.	WNIOSKI.....	94
7.	LITERATURA	97

Streszczenie

Ksylogeneza (formowanie drewna) jest złożonym procesem rozwojowym obejmującym podział komórek, różnicowanie, odkładanie wtórnej ściany komórkowej, lignifikację oraz programowaną śmierć komórki. Wydajność ksylogenezy determinuje zdolność do transportu wody i tolerancję na suszę u drzew. Biochemiczne i molekularne podstawy ksylogenezy w warunkach stresowych nie są jeszcze w pełni poznane u sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu stresu suszy na bardzo młode siewki sosny zwyczajnej, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w markerach stresu oksydacyjnego oraz ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres i formowaniem drewna. Nasiona sosny zwyczajnej pozyskane z plantacji nasiennej w Nadleśnictwie Białogard wysiano na torfowe krążki (pH 6) i hodowano w warunkach naturalnego oświetlenia. Przez 20 dni siewki podlewano co drugi dzień w celu ujednolicenia wzrostu. W dniu 21. wywołano stres suszy poprzez zaprzestanie podlewania w grupie stresowej, podczas gdy grupa kontrolna nadal otrzymywała wodę destylowaną. Próby pobierano w dniu 0 (przed zastosowaniem stresu) oraz w dniach 1., 3., 5., 7. i 8. od wystąpienia stresu; w dniu 7. grupę stresową ponownie podlano w celu oceny zdolności regeneracji. Stres oksydacyjny oceniano w dwóch frakcjach tkankowych - epikotylach oraz hipokotylach z korzeniami, mierząc peroksydację lipidów (metoda TBARS), poziom anionorodnika ponadtlenkowego (test redukcji NBT) oraz zawartość nadtlenu wodoru (kolorymetryczna metoda z odczynnikami tytanowymi). Ekspresję genów analizowano metodą qPCR w czasie rzeczywistym (metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Badano cztery geny: *DHN1* (dehidryna, odpowiedź na stres osmotyczny), *PIN1* (transport auksyn), *COMT* (biosynteza ligniny) oraz *HDZ33* (czynnik transkrypcyjny zaangażowany w regulację rozwoju). Do normalizacji wykorzystano dwa geny referencyjne: *aktynę* i *EF1a*. *EF1a* wykazał większą stabilność w warunkach doświadczenia. Wszystkie trzy markery stresu oksydacyjnego wykazały spójną tendencję wzrostową w okresie suszy, osiągając najwyższe wartości w dniu 7., a następnie spadek po ponownym podlaniu w dniu 8., co sugeruje częściową aktywację mechanizmów antyoksydacyjnych po przywróceniu dostępu do wody. Najwyraźniejszy sygnał zaobserwowano dla peroksydacji lipidów (TBARS), która wzrastała w obu frakcjach tkankowych przez cały okres suszy. Poziomy nadtlenu wodoru wykazały podobny wzorzec. Dynamika anionorodnika ponadtlenkowego była mniej jednoznaczna - statystycznie istotną różnicę między siewkami stresowanymi a kontrolnymi wykryto jedynie w dniu 8. w hipokotylach i korzeniach (test U Manna-Whitneya, $p = 0,030$), gdzie poziomy $O_2^{\bullet-}$ były niższe u wcześniej stresowanych roślin, co może odzwierciedlać zmienioną dynamikę ROS po ponownym podlaniu. Z powodu wysokiej zmienności międzyosobniczej żadne z pozostałych porównań nie osiągnęło istotności statystycznej ($p > 0,05$). Na poziomie molekularnym *DHN1* wykazał najsilniejszą odpowiedź - 70-krotną indukcję z najwyższą wartością w dniu 5., zgodną z rolą genu we wczesnej ochronie osmotycznej. Ekspresja *PIN1* była najwyższa w dniu 1. i wykazywała spadek w kolejnych dniach, co sugeruje udział w początkowej odpowiedzi na deficyt wody. Ekspresja *COMT* wykazała niewielki wzrost około dni 3.-5., który może być związany z przejściowym zwiększeniem biosyntezy ligniny w pośredniej fazie stresu suszy. Natomiast ekspresja *HDZ33* wzrastała stopniowo przez cały okres doświadczenia i osiągnęła najwyższe poziomy w dniach 7.-8., co sugeruje możliwy udział w długoterminowych zmianach rozwojowych i regeneracji po stresie. Mimo zaobserwowania kilku trendów, żadna z różnic między siewkami stresowanymi a kontrolnymi nie była statystycznie istotna ($p > 0,05$), co prawdopodobnie wynikało z wysokiej zmienności biologicznej i stosunkowo małej liczby powtórzeń. Wyniki sugerują, że stres suszy wpływa zarówno na parametry biochemiczne, jak i ekspresję genów u młodych siewek sosny zwyczajnej. Zmiany w markerach stresu oksydacyjnego i profilach transkrypcji mogą odzwierciedlać aktywację zarówno wczesnych odpowiedzi ochronnych, jak i długoterminowych procesów adaptacyjnych. Częściowa regeneracja obserwowana po ponownym podlaniu sugeruje, że siewki zachowały pewną zdolność do reagowania na krótkotrwały stres suszy i regeneracji po nim. Do potwierdzenia tych obserwacji konieczne są dalsze badania oparte na większych grupach doświadczalnych.

Słowa kluczowe: *Pinus sylvestris*, ksylogeneza, stres suszy, stres oksydacyjny, TBARS, reaktywne formy tlenu, qPCR, *DHN1*, *PIN1*, *COMT*, *HDZ33*

Abstract

Wood formation (xylogenesis) is a complex developmental process including cell division, differentiation, secondary cell wall deposition, lignification, and programmed cell death. The efficiency of xylogenesis determines water transport capacity and drought tolerance in trees. The formation of xylem tissue plays an important role in water transport and drought tolerance in trees. However, the biochemical and molecular background of xylogenesis under stress conditions is still not fully understood in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). The aim of this study was to examine the effects of drought stress in very young Scots pine seedlings, particularly changes in oxidative stress markers and the expression of genes related to stress response and wood formation. Scots pine seeds obtained from a seed plantation in the Białogard Forest District were sown on peat pellets (pH 6) and cultivated under natural light conditions. Seedlings were watered every other day for 20 days to establish uniform growth. On day 21, drought stress was induced by stopping watering in the stress group, while the control group continued to receive distilled water. Samples were collected at day 0 (pre-stress) and on days 1, 3, 5, 7, and 8 after stress onset; on day 7, the stress group was rewatered to assess recovery capacity. Oxidative stress was evaluated in two tissue fractions — epicotyls and hypocotyls with roots, by measuring lipid peroxidation (TBARS method), superoxide anion levels (NBT reduction assay), and hydrogen peroxide content (colorimetric titanium reagent method). Gene expression was analysed by real-time qPCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method), targeting four genes: *DHN1* (dehydrin, osmotic stress response), *PIN1* (auxin transport), *COMT* (lignin biosynthesis), and *HDZ33* (homeodomain-leucine zipper transcription factor involved in developmental regulation). Two reference genes, actin and *EF1a* were used for normalisation. *EF1a* showed greater stability under experimental conditions. All three oxidative stress markers showed a consistent upward trend during the drought period, reaching peak values on day 7, followed by a decrease after rewatering on day 8, suggesting partial activation of antioxidant mechanisms upon water restoration. The clearest signal was observed for lipid peroxidation (TBARS), which increased in both tissue fractions throughout the drought period. Hydrogen peroxide levels followed a similar pattern. Superoxide anion dynamics were less consistent - a statistically significant difference between stressed and control seedlings was detected only on day 8 in hypocotyls and roots (U Mann–Whitney, $p = 0.030$), where $O_2^{\cdot -}$ levels were lower in previously stressed plants, possibly reflecting altered ROS dynamics after rewatering. Due to high inter-individual variability, none of the other comparisons reached statistical significance ($p > 0.05$). At the molecular level, *DHN1* showed the strongest response, with a 70-fold induction peaking on day 5, consistent with a role in early osmotic protection. *PIN1* was most strongly expressed on day 1 and declined later, suggesting involvement in the initial auxin-mediated growth adjustment to water deficit. *COMT* expression showed a small increase around days 3–5, which could be related to temporary activation of lignin biosynthesis during the intermediate phase of drought stress. In contrast, *HDZ33* expression increased gradually over the course of the experiment and reached its highest levels on days 7–8, suggesting possible involvement in longer-term developmental changes and post-stress recovery. Although several expression trends were observed, none of the differences between stressed and control seedlings were statistically significant ($p > 0.05$). This was probably related to high biological variability and the relatively small number of replicates. Overall, the results suggest that drought affects both biochemical parameters and gene expression in young Scots pine seedlings. Changes in oxidative stress markers and transcription profiles may reflect the activation of both early protective responses and longer-term adaptive processes. The partial recovery observed after rewatering suggests that the seedlings retained some ability to respond to and recover from short-term drought stress. Further studies based on larger experimental groups are needed to confirm these observations.

Keywords: *Pinus sylvestris*, xylogenesis, drought stress, oxidative stress, TBARS, reactive oxygen species, qPCR, *DHN1*, *PIN1*, *COMT*, *HDZ33*

1. WSTĘP

Formowanie drewna (ksylogeneza) to skomplikowany proces, który obejmuje podziały komórkowe, różnicowanie komórek, wzmacnianie i lignifikację ścian komórkowych, prowadzące w efekcie do powstania dojrzałej strukturalnie i funkcjonalnie tkanki drewna. W skład ksylemu wchodzi zarówno martwe elementy przewodzące (cewki, naczynia), jak i żywe komórki miękiszowe, przy czym to martwe elementy przewodzące w największym stopniu determinują właściwości hydrauliczne drewna. Martwe komórki po zróżnicowaniu nie mogą się już wtórnie przystosować do zmieniających się warunków środowiska. Najistotniejsze dla ich kondycji są więc warunki, w jakich powstają, stąd proces ksylogenezy ma fundamentalne znaczenie dla późniejszej efektywności przewodzenia wody w roślinie (Quaderi i in. 2019).

Choć kluczowe znaczenie mają warunki formowania ksylemu, jego funkcjonowanie w późniejszym okresie może być dodatkowo modyfikowane przez procesy fizjologiczne i sezonową zmienność środowiska

Poznanie procesu formowania ksylemu jest też istotne ze względów przemysłowych i biotechnologicznych, ponieważ celuloza i lignina reprezentują znaczącą część biomasy na Ziemi i ich udział w obiegu węgla w przyrodzie jest kluczowy (Fukuda 1996). Możliwość zastosowania metod inżynierii genetycznej na pierwszych etapach powstawania tkanki drzewnej mogłaby prowadzić do poprawy jakości wytwarzanego papieru czy wydajności drewna jako źródła bioenergii, stąd wiele najnowszych projektów badawczych dotyczących ksylogenezy skupia się na molekularnych czynnikach wpływających na formowanie drewna (De Micco i in. 2019; Akiyoshi i in. 2020; Liu i Wang 2020).

Rozwój zaawansowanych technik biologii molekularnej umożliwił przeprowadzenie analiz genetycznych podstaw omawianego procesu - wykazano m.in., że formowanie ksylemu podlega regulacji głównie na poziomie transkrypcji. Większość badań dotyczących molekularnych podstaw procesu ksylogenezy przeprowadzono jednak na organizmie modelowym – rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*), natomiast można przypuszczać, że mechanizmy odkryte u roślin zielnych są na tyle konserwatywne, że przynajmniej niektóre z nich można zaobserwować również u roślin drzewiastych. Specyfika budowy drewna drzew wskazuje jednak na obecność dodatkowych mechanizmów regulatorowych, które stanowią przedmiot dalszych badań i wciąż nie zostały w pełni scharakteryzowane (Guerriero i in. 2013). Badania mające na celu poznanie genów zaangażowanych w omawiany proces u roślin drzewiastych są obecnie prowadzone głównie na różnych gatunkach topoli, takich jak *Populus tomentosa* (Wang i in. 2016), *P. tremula* L. (Sundell i in. 2017), *P. deltoides* czy *P. nigra* (Zhang

i in. 2020). Drzewa iglaste, w tym sosna, są również przedmiotem zainteresowania badaczy w kontekście formowania drewna, jednak najbardziej rozpowszechniona w stresie klimatu umiarkowanego sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) jest pod tym względem znacznie mniej poznana niż inne gatunki z tego rodzaju, w tym przede wszystkim *Pinus radiata* (Cato i in. 2006, Li i in. 2011) oraz *Pinus taeda* (Yang i in. 2004, Bomal i in. 2008, Palle i in. 2011).

Proces powstawania drewna, od podziału pierwszej komórki prokambium do wykształcenia w pełni funkcjonalnej, dojrzałej tkanki ksylemu, może być przedmiotem badań obejmujących zarówno mechanizmy molekularne czy procesy biochemiczne, jak i wpływ przebiegu tych procesów na ostateczną morfologię i właściwości mechaniczne drewna. W kolejnych etapach formowania ksylemu obserwowany jest wzrost lub spadek ekspresji konkretnych genów, w tym czynników transkrypcyjnych pełniących domniemaną funkcję regulacyjną. Biosynteza wtórnej ściany komórkowej, jak również jej późniejsza lignifikacja wymagają obecności specyficznych enzymów, takich jak syntaza celulozy czy enzymy szlaku fenylopropanoidowego. Ostatnim etapem różnicowania komórek ksylemu jest programowana śmierć komórki, której towarzyszą specjalne mechanizmy sygnalizacyjne.

1.1. Ogólny przebieg procesu ksylogenezy

Głównym elementem strukturalnym ksylemu iglastych są cewki, które pełnią jednocześnie funkcję przewodzącą i wzmacniającą. Promienie łykoдрzewne przebiegają prostopadle do cewek i składają się zwykle z komórek miękiszowych. U niektórych iglastych obserwuje się również tzw. cewki promieniowe. U *Pinaceae* na ścianach cewek występują jamki lejkowate zamykane błoną z dyskowatym zgrubieniem (torusem). U *Pinus sylvestris* jamki są typu okienkowego (Hejnowicz 2002).

Proces ksylogenezy można podzielić na dwa główne etapy, na które składa się kilka kluczowych zdarzeń. Etap pierwszy (wczesny) obejmuje powstawanie i rozwój komórek prokambialnych. W drugim etapie (późnym) zachodzi różnicowanie komórek kambium w elementy przewodzące, pogrubienie ścian komórkowych i lignifikacja, a w końcu programowana śmierć (PCD) komórek drewna (Yang i in. 2004).

1.1.1 Etap I

Komórki prokambium pojawiają się już w stadium zarodkowym, jednak u roślin drzewiastych ich dalsze losy i przejście w aktywne kambium waskularne są procesem rozciągniętym w czasie. Niewiele wiadomo na temat determinacji rozwojowej tych komórek, czy ich przyszła funkcja jest ustalana na etapie elongacji, czy dopiero w dojrzałych komórkach prokambialnych. Sygnalizacja związana z tym procesem również wymaga dalszych badań (Fukuda 1996). W roślinach zielnych komórki prokambium pozostają w stanie nieodróżnionym dzięki delikatnej równowadze sygnalizacji hormonalnej, w której auksyna promuje różnicowanie komórek ksylemu, podczas gdy cytokinina działa antagonistycznie, stabilizując merystematyczny charakter tkanek (Wang i in. 2023).

Kambium waskularne to cienka warstwa tkanki składająca się z wydłużonych komórek merystematycznych. Nie jest ona jednorodna, u roślin drzewiastych występują w niej dwa rodzaje komórek inicjalnych: wrzecionowate oraz promieniowe. Komórki wrzecionowate są silnie wydłużone na przekroju podłużnym, natomiast komórki promieniowe są na tym przekroju mniej więcej równowymiarowe (Hejnowicz 2002). Podziały tych komórek są o tyle istotne, że przyczyniają się do wyprodukowania dużej części biomasy na Ziemi (De Micco i in. 2019). Zdolność wtórnego przyrostu u roślin drzewiastych umożliwiła im wykształcenie tkanki przewodzącej transportującej wodę na dużą wysokość i dzięki temu osiągnięcie dużo większych rozmiarów niż rośliny zielne.

Pobieranie wody przez komórki kambium umożliwia powiększanie ich rozmiarów i podziały mitotyczne. Ciśnienie turgorowe, wywołane gradientem potencjału wody między cytoplazmą, wakuolą a apoplastem, powoduje nacisk protoplastu na ścianę komórkową. Wpływa to na rozluźnianie ścian komórkowych i wydłużanie się komórek, które przyjmują kształt wrzecionowaty charakterystyczny dla omawianej tkanki (Funada i in. 2016, Liang i in. 2016).

1.1.2 Etap II

W momencie, gdy komórki kambium utracą możliwość podziałów, rozpoczyna się odkładanie wtórnej ściany komórkowej i różnicowanie w kierunku wtórnego ksylemu lub

floemu. W obrębie ksylemu komórki wrzecionowate różnicują się w kierunku cewek (u iglastych), naczyń (u liściastych), włókien drzewnych oraz komórek miękiszu osiowego. Komórki promieniowe dają początek promieniom łykodrzewnym, a u niektórych iglastych, takich jak sosna czy modrzew, również cewkom promieniowym (Hejnowicz 2002, Funada i in. 2016). Komórki w trakcie różnicowania w elementy przewodzące charakteryzują się dużym zagęszczeniem mikrotubul kortykalnych oraz silnie rozwiniętą siecią *trans* aparatu Golgiego, z ciemnymi, wyraźnymi pęcherzykami (Samuels i in. 2002).

Jednocześnie w blaszce środkowej rozpoczyna się lignifikacja ściany, która postępuje poprzez ścianę pierwotną, aż do warstw ściany wtórnej. Grubość odkładanej wtórnej ściany komórkowej zależy od gatunku, wieku kambialnego, funkcji komórek czy typu tkanki (drewno wczesne lub późne).

Programowana śmierć komórki (PCD) to genetycznie zaprogramowany proces fizjologiczny, zachodzący zarówno u roślin jak i u zwierząt. W odróżnieniu od nekrozy, również skutkującej śmiercią komórki, PCD to proces ściśle kontrolowany, zachodzący w nieco inny sposób, mający na celu selektywne eliminowanie komórek organizmu. Podlegają mu komórki uszkodzone, komórki które nie są dłużej potrzebne, gdyż mają tymczasową rolę (np. okrywającą), ale również takie, których funkcja zakłada konieczność usunięcia protoplastu, tak jak w przypadku martwych elementów drewna (Pennell i Lamb 1997). W początkowym etapie jądro i cytoplazma ulegają kondensacji i fragmentacji. Cytoplazma rozpada się na drobne fragmenty, następnie pęka centralna wakuola i uwalniane są enzymy hydrolityczne degradujące zawartość komórki ksylemu. Istotną rolę w PCD odgrywają m.in. nukleazy, proteazy (Moshchenskaya i in. 2022) oraz enzymy związane z metabolizmem reaktywnych form tlenu (nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego) (Bestwick i in. 1997, Pastori i del Rio 1997).

W komórkach miękiszowych promieni łykodrzewnych również zachodzi lignifikacja, ale protoplast zwykle nie ulega autolizie i mogą one pozostawać żywe przez wiele lat. Dzięki temu mogą pełnić funkcje zapasowe bądź transportowe, magazynując lub przekazując substancje odżywcze oraz metabolity wzdłuż promieni w całym pniu (Funada i in. 2016).

1.2. Genetyczne podstawy procesu ksylogenezy

U *Arabidopsis thaliana* opisano zestaw kluczowych zdarzeń związanych z formowaniem ksylemu i floemu (Guerriero i in. 2014). Istotne znaczenie dla formowania drewna przypisuje się regulacji hormonalnej. Do hormonów roślinnych zaangażowanych w procesy wzrostowe można zaliczyć przede wszystkim auksyny i cytokiny. Geny związane z sygnalizacją z udziałem tych związków, których ekspresja była indukowana podczas różnych stadiów ksylogenezy to m.in. *ARF* (*Auxin Response Factor*), czy geny kodujące aktywne transportery auksyn (*PIN1*).

Odkryto m.in. rolę auksyn w różnicowaniu prokambialnych komórek prekursorowych. Jednym z najwcześniejszych zdarzeń jest ustanowienie dodatniego sprzężenia zwrotnego, w którym auksyna indukuje ekspresję genu białka MP, co zapoczątkowuje aktywację białka PIN, które ponownie wzmacnia działanie auksyny. Białko MP ma zdolność aktywacji czynników transkrypcyjnych (TMO5/TMO6, ATHB8) które przyczyniają się do różnicowania komórek miękiszowych w komórki prokambium. Auksyna indukuje też ekspresję genu *HD-ZIP III* kodującego białko utrzymujące równowagę między podziałami komórek a ich różnicowaniem i aktywujące szlak prowadzący do rozwoju prekursorów ksylemu. Ksylem jest tkanką niejednorodną i składa się z kilku typów komórek. Początkowe stadia różnicowania komórek ksylemu są regulowane przez czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC (Moschchenskaya i in. 2022). Rodzina NAC to jedna z największych rodzin czynników transkrypcyjnych, występujących u wielu gatunków roślin i pełniących funkcje w regulowaniu wzrostu i rozwoju, a także w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny. Białka te charakteryzują się obecnością domeny NAC wiążącej DNA po N-końcowej stronie cząsteczki (Lip i in. 2013). Czynniki transkrypcyjne należące do rodziny NAC kontrolują przyporządkowanie nowo powstających komórek drewna do danego typu. Produkty genów *VND6* i *VND7* aktywują program specyficzny dla tworzenia naczyń, podczas gdy *SND1*, *NST1* i *NST2* są odpowiedzialne za tworzenie włókien. Gen *KANADI* po stronie floemu hamuje aktywność PIN1.

Celem badania molekularnych podstaw ksylogenezy u roślin drzewiastych jest przede wszystkim ustalenie, jak ekspresja genów zaangażowanych w formowanie drewna wpływa na jego ostateczną budowę oraz właściwości. Pomimo istnienia licznych koncepcji mających na celu zobrazowanie podstaw tego procesu, zagadnienie to jest wciąż nie do końca poznane i nasuwa się wiele pytań oczekujących na odpowiedzi. Niektóre geny potencjalnie związane z formowaniem drewna zostały już zidentyfikowane u roślin drzewiastych m.in. z

zastosowaniem metod analizy mikromacierzy (Yang i in. 2004). Ekspresja tych genów jest istotnie wyższa w ksylemie niż w innych tkankach.

Analizy transkryptomyczne przeprowadzone u *Populus tremula* (Sundell i in. 2017) wyróżniły cztery etapy procesu ksylogenezy, pomiędzy którymi zachodzą trzy specyficzne przemiany genetyczne. Pierwsze z tych przemian mają miejsce podczas podziału komórek kambium i różnicowania ich w kierunku przyszłego ksylemu bądź floemu. Na tym etapie następował stopniowy wzrost ekspresji genów *SND1* i *SND2* (geny opisane u *A. thaliana*), których funkcja, jak zasugerowano, może być związana z tworzeniem włókien, zarówno drzewnych jak i łykowych. Kolejny istotny punkt to rozpoczęcie biosyntezy wtórnej ściany komórkowej w komórkach drewna, a ostatni – jej zakończenie. Podczas formowania wtórnej ściany wykazano wysoką ekspresję m.in. homologów *VND6* i *VND7*, co potwierdza ich rolę w powstawaniu funkcjonalnej tkanki przewodzącej. Co ciekawe, 48% badanych sekwencji ulegających ekspresji u osiki miało swoje ortologi u *Picea abies*, pomimo że drogi ewolucyjne tych dwóch rodzajów rozeszły się ponad 200 milionów lat temu. U *Populus trichocarpa* czynniki transkrypcyjne WND z rodziny czynników NAC aktywują transkrypcję genów dla grupy czynników PtrMYB2, PtrMYB3, PtrMYB20 i PtrMYB21 (McCarthy i in. 2010, Zhong i in. 2013), które są odpowiedzialne bezpośrednio za regulację biosyntezy składników ścian komórkowych, w tym celulozy, hemiceluloz czy lignin (Eckert i in. 2019).

Wśród roślin nagonasiennych kandydatem na wartościowy organizm modelowy jest sosna (*Pinus* sp.). Jest najlepiej scharakteryzowanym rodzajem ze wszystkich drzew iglastych, a jej wzrost, rozwój i rozmnażanie są dobrze udokumentowane (Lev-Yadun i Sederoff 2000). Dotychczas przeprowadzone badania molekularne wykazały, że u różnych gatunków sosny podczas formowania ksylemu aktywne są przede wszystkim geny związane bezpośrednio z biosyntezą celulozy i ligniny, a także geny kodujące białka enzymatyczne zaangażowane w modyfikowanie i reorganizację ściany komórkowej, w tym glukozydazy, glikozylotransferazy czy ekspansyny (Whetten i in. 2001).

W genomie *Pinus taeda* zidentyfikowano ponad 30 genów odpowiadających za syntezę czynników transkrypcyjnych z rodziny NAC (Lip i in. 2022). U sosny nie znaleziono jednak dotychczas homologów genów *SND* i *NST*, które opisano u topoli. Być może geny te wyewoluowały już po rozejściu się linii ewolucyjnych, które zapoczątkowały powstanie roślin okryto- i nagonasiennych i może to być związane z większym zróżnicowaniem budowy drewna u tych pierwszych (Liu i Wang 2020). Udało się natomiast wykryć u *P. taeda* pięć homologów czynników transkrypcyjnych z rodziny *VND* (*PtaVNS*), z których cztery wykazywały wysoką

ekspresję w obrębie różnicującego się ksylemu. Wiadomo również, że białka PtaVNS zlokalizowane są w jądrze komórkowym, co jest ściśle związane z ich funkcją w aktywacji transkrypcji (Akiyoshi i in. 2020). W rozwijającym się ksylemie u *P. taeda* opisano też homologii *MYB Arabidopsis thaliana* (*PtMYB1*, *PtMYB2* i *PtMYB4*) powiązane ze szlakiem fenylopropanoidowym i biosyntezą ligniny (Palle i in. 2011, Luo i Li 2022).

Oдноśnie programowanej śmierci komórek drewna zachodzącej w końcowym etapie ich różnicowania, u *P. sylvestris* zidentyfikowano przynajmniej 3 rodziny genów markerowych związanych z tym procesem. Są to geny kodujące bifunkcjonalną endonukleazę (*BFN*), endopeptydazę cysteinową (*CEP*) oraz metakaspazę (*MCI*). Poziom ekspresji tych genów nie był powiązany z wiekiem komórek kambium, lecz zmieniał się w zależności od lokalizacji i rodzaju tkanki (Moshchenskaya i in. 2022). Istnieją zatem wyraźne dowody na to, że ekspresja genów związanych z formowaniem tkanki drzewnej jest zróżnicowana przestrzennie, a to zróżnicowanie może mieć istotny wpływ na ostateczne właściwości drewna. U *P. radiata* geny zaangażowane w podziały komórkowe wykazywały wyższą ekspresję w koronie drzewa niż u podstawy pnia, natomiast w dolnej części pnia były aktywne głównie geny, których przewidywana funkcja ma związek z odkładaniem wtórnych ścian komórkowych. Jest wysoce prawdopodobne, że ma to związek z wyraźnie wolniejszym tempem zachodzenia podziałów komórek kambialnych w dolnej części pnia, niż w koronie drzewa. Wiadomo również, że w drewnie reakcyjnym ekspresja genów zaangażowanych w ksylogenezę może ulegać zmianom (Cato i in. 2006).

Należy wspomnieć także o epigenetycznej regulacji procesu ksylogenezy poprzez niekodujące sekwencje miRNA (microRNA), które zawierają 20-24 nukleotydów i wpływają na ekspresję genów m.in. poprzez metylację DNA czy modyfikacje białek histonowych (Nguyen i in. 2023).

Chociaż większość mechanizmów regulujących różnicowanie komórek przewodzących została szczegółowo opisana u *Arabidopsis thaliana*, wiele z tych szlaków sygnałowych wykazuje wysoki stopień konserwatywności w świecie roślin. Dlatego wyniki badań uzyskane w tym modelu często stanowią punkt odniesienia dla analiz prowadzonych u gatunków drzewiastych. Należy jednak podkreślić, że bezpośrednia ekstrapolacja tych mechanizmów na rośliny nagonasienne, w tym przedstawicieli Pinaceae, wymaga ostrożności i dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

1.3. Biosynteza ścian komórkowych

Ściana komórkowa to bardzo istotny element strukturalny odróżniający organizmy należące do królestw roślin i grzybów od organizmów zwierzęcych, które tej struktury nie posiadają. U roślin drzewiastych jest ona zbudowana z kilku warstw. Warstwa najbardziej zewnętrzna, łącząca dwie komórki to tzw. blaszka środkowa (M), zbudowana głównie z pektyn, zawierająca znaczący udział ligniny, szczególnie w komórkach wtórnie zdrewniałych. Przylega do niej ściana pierwotna, stosunkowo cienka warstwa zawierająca celulozę z domieszką pektyn i hemiceluloz. Fibryle celulozowe w obrębie ściany pierwotnej są ułożone skośnie do osi podłużnej komórki. Taki układ umożliwia elongację komórki i jej dalsze różnicowanie. Kolejną warstwą, licząc od zewnątrz w kierunku światła komórki, jest ściana wtórna, która jest zbudowana z trzech pokładów. Najbardziej zewnętrzny z nich, S1, ma skośny układ fibryli w stosunku do podłużnej osi. Pokład S2 jest najgrubszy (ponad 70% grubości całej ściany), a fibryle są w nim ułożone równoległe do osi. Ostatni pokład, S3, jest dużo cieńszy i zbudowany również z celulozy i hemiceluloz, a fibryle są w nim ułożone spiralnie (Hejnowicz 2002, Kozakiewicz 2012). Synteza polisacharydów budujących ściany komórkowe jest regulowana poprzez dostępność prekursorów, czyli fosforanów monosacharydów, ich lokalizację i transport. (Fukuda 1996), a także poprzez regulację ekspresji genów kodujących enzymy biosyntetyczne oraz ich aktywność enzymatyczną.

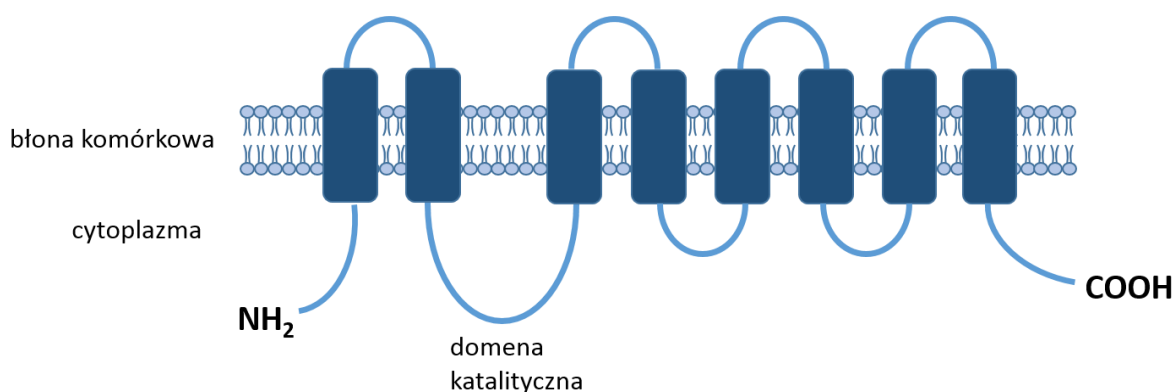
1.3.1 Celuloza

Od dawna podejrzewano, że mikrotubule kortykalne determinują rozmieszczenie mikrofibryli celulozowych w ścianie komórkowej. Zaburzenia w organizacji mikrotubul, np. spowodowane dodaniem kolchicyny (inhibitora polimeryzacji tubuliny) skutkowały formowaniem nieregularnych zgrubień wtórnej ściany komórkowej (Pickett-Heaps 1967). W 2006 roku Paredez i in. poprzez wizualizację z użyciem fluorescencyjnego znakowania białka wykazali przewidywaną wcześniej funkcję mikrotubul w organizacji układu mikrofibryli celulozowych w komórkach.

Kompleks enzymatyczny syntazy celulozy (CSC) występuje w błonie komórkowej i składa się z podjednostek syntazy celulozy (CesA) (ryc.1). Dotychczas nie udało się wyizolować całego funkcjonalnego kompleksu, ale znane są poszczególne podjednostki, które występują przypuszczalnie w formie dimerów lub oligomerów (Turner i Kumar 2017). Liczba

podjednostek w obrębie pojedynczego kompleksu jest szacowana na przynajmniej 18. Wiadomo też, że ulegają one modyfikacji poprzez dołączanie grup S-acylowych do reszt cysteinowych, co wpływa na zwiększenie hydrofobowości całego kompleksu błonowego (Kumar i in. 2016).

Podjednostki CesaA (rozety) należą do rodziny glikozylotransferaz-2 (GT-2) i odpowiadają za syntezę materiału do budowy wtórnej ściany komórkowej. Składają się najprawdopodobniej z ośmiu domen transbłonowych z N- i C-końcami umieszczonymi po stronie cytoplazmatycznej. Między domeną 2 i 3 w cytoplazmie występuje duża pętla stanowiąca prawdopodobnie domenę katalityczną enzymu (McFarlane i in. 2014).



Ryc. 1. Uproszczony schemat obrazujący kompleks enzymatyczny syntazy celulozy zlokalizowany w błonie komórkowej. Opracowanie własne na podst. McFarlane i in., 2014.

W błonie komórkowej ich rozmieszczenie i poruszanie się jest wyznaczone przez ułożenie mikrotubul korykalnych. Wykryto obecność białek CesaA także w aparacie Golgiego, co sugeruje, że nowe kompleksy enzymatyczne są w sposób ciągły transportowane do błony w pęcherzykach Golgiego podczas syntezy ścian komórkowych (Fukuda 1996).

U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano i zaproponowano funkcje dla przynajmniej 10 genów kodujących białka związane z syntezą celulozy. Najważniejsze z nich to *AtCesA1*, *AtCesA2*, *AtCesA3*, *AtCesA5*, *AtCesA6* oraz *AtCesA9*, które biorą udział w biosyntezie ściany pierwotnej w komórkach tkanek przewodzących (Burn i in. 2002, McFarlane i in. 2014). Mutacje w obrębie tych sekwencji powodowały zaburzenia w syntezie łańcuchów celulozy, akumulację niekrystalicznych form β -1,4-glukanu, zmiany ultrastrukturalne i morfologiczne

(Arioli i in. 1998). Najistotniejsze dla wzrostu i rozwoju roślin wydają się *AtCesA1*, 3 i 6, ponieważ są niezbędne w rozwoju ścian ziaren pyłku i delecje w tych rejonach uniemożliwiają rozmnażanie płciowe (Persson i in. 2007).

Kolejne istotne geny *AtCesA4*, *AtCesA7* i *AtCesA8* są prawdopodobnie zaangażowane w syntezę celulozy budującej mikrofibryle ściany wtórnej (Burn i in. 2002, Zhang i in. 2004).

1.3.2 Hemicelulozy

Hemicelulozy stanowią jedną z głównych grup polisacharydów budujących ściany komórkowe roślin i odgrywają istotną rolę w utrzymaniu ich integralności strukturalnej oraz właściwości mechanicznych. Podczas formowania wtórnej ściany wzrasta ekspresja ksylozylotransferazy i spada ekspresja syntazy kwasu poligalakturonowego oraz arabinozylotransferazy (Fukuda 1996). U *Arabidopsis* udowodniono udział ksylozylotransferaz (XXT1, XXT2) w biosyntezie ksylanu i wykazano, że są one konieczne dla powstawania funkcjonalnych ścian komórkowych u roślin (Cavalier i in. 2008). Ksylozylotransferaza dołącza reszty ksylozylowe poprzez wiązanie β - (1 $\rightarrow$ 4) do ksylooligosacharydów, co stwierdzono m.in. w komórkach soi (Hayashi i in. 1981) czy w siewkach pszenicy (Kuroyama i Tsumuraya 2001). U sosny zwyczajnej w błonach komórek różnicującego się ksylemu znajduje się kompleks enzymatyczny odpowiedzialny za syntezę hemiceluloz, który przypomina strukturalnie syntazę celulozy (Dalessandro i in. 1988). Kompleks ten jest syntetyzowany w błonach siateczki śródplazmatycznej i podobnie jak w przypadku syntazy celulozy, jest modyfikowany, a następnie transportowany w pęcherzykach Golgiego do błony komórkowej.

Hemicelulozy odgrywają kluczową rolę w budowie wtórnych ścian komórkowych drzew iglastych. W ścianach komórkowych u tych roślin dominują dwa główne typy hemiceluloz: galaktoglukomannan (GGM) i arabinoglukuronoksylan (AGX), które stanowią odpowiednio około 10–30% i 5–15% masy wtórnych ścian komórkowych. GGM zbudowany jest z β -1,4-połączonych jednostek mannozy i glukozy, a boczne grupy galaktozy i reszty acetylowe są przyłączane odpowiednio w pozycjach α -1,6 oraz na C2 lub C3 mannozy. Z kolei AGX składa się z β -1,4-połączonych jednostek ksylozy z przyłączonymi resztami 4-O-metylokwasu glukuronowego (MeGlcA) i arabinofuranozy (Ara) (Lyczakowski i in. 2021).

1.3.3 Substancje pektynowe

Substancje pektynowe to liniowe polimery zbudowane z 300 do 1000 cząsteczek kwasu D-galakturnowego, powiązanych ze sobą wiązaniami α -1 $\rightarrow$ 4 glikozydowymi. Grupy karboksylowe w łańcuchu polisacharydowym mogą być estryfikowane grupami metylowymi, a stopień metylacji tych grup wpływa na właściwości fizyczne pektyn. Monomery wchodzące w skład łańcucha są często zastępowane monosacharydami, takimi jak ramnoza, arabinoza, galaktoza, ksyloza czy fukoza. Wśród pektyn istnieją różne typy polimerów. Można wyróżnić homogalakturnan o liniowym łańcuchu polisacharydowym, który stanowi 60-65% substancji pektynowych obecnych w roślinach, ramnogalakturnan I i II o rozgałęzionych łańcuchach, ksylogalakturnan, w którym węgiel C-3 podstawiony jest cząsteczką β -D-ksylozy, oraz arabinan i arabinogalaktan zawierające cząsteczki arabinozy (Pińkowska i Złocińska 2014). Wszystkie substancje pektynowe łączy fakt, że mają własności koloidalne, a ich rozpuszczalność zależy od stopnia polimeryzacji i estryfikacji. Wzrost stopnia metylacji ma wpływ na zwiększenie rozpuszczalności pektyn w wodzie (Blaim 1968).

Substancje pektynowe są charakterystyczne dla królestwa roślin; u zwierząt dotąd ich nie wykryto. Obecne są głównie w młodych rosnących tkankach, przede wszystkim w owocach, ale także w blaszce środkowej ścian komórkowych. Początkowo sądzono, że w tkankach zdrewniałych pektyny raczej nie występują (Blaim 1968). Związki te są dość trudne do wykrycia ze względu na podatność ich wiązań glikozydowych na hydrolizę kwasową i zasadową. Zastosowanie metod immunocytochemicznych wykorzystujących specyficzne przeciwciała umożliwiło uwidocznienie pektyn również w obrębie zróżnicowanej tkanki ksylemu *Pinus sylvestris*. U tego gatunku sosny w blaszce środkowej oraz tkankach na etapie różnicowania homogalakturnany kwaśne i estryfikowane były obecne w podobnych ilościach, natomiast w tkankach zdrewniałych ulegających lignifikacji przeważały pektyny w formie metylowanej (Hafrén i in. 2000). U *Pinus radiata* w dojrzałej tkance ksylemu pektyn w ogóle nie wykryto (Putoczki i in. 2008), co potwierdza przypuszczenie, że związki te są charakterystyczne głównie dla ścian komórkowych pierwotnych, a nie wtórnych.

Zadaniem substancji pektynowych w ścianach komórkowych jest prawdopodobnie stabilizacja jej struktury i regulacja wzrostu komórki. Uczestniczą one również w procesie adhezji komórek w obrębie tkanki, co zapewnia jej integralność i wzmocnienie. W ujęciu ultrastrukturalnym pektyny stabilizują szkielet zbudowany z celulozy i innych polisacharydów

poprzez tworzenie swoistej macierzy o konsystencji żelu, która zapobiega dezintegracji struktury ścian. Pektyny reprezentują więc element ścian komórkowych, który ma bardzo istotny wpływ na budowę i jakość powstającej tkanki drzewnej, a nieprawidłowa ich dystrybucja może się przyczynić do pojawienia się pęknięć i innych wad w dojrzałym drewnie (Putoczki i in. 2008).

1.3.4 Ligniny

Lignifikacja ścian komórkowych zapewnia im hydrofobowość i sztywność. Lignina jest polimerem złożonym z podjednostek pochodnych alkoholi fenolowych – koniferylowego, synapinowego i p-kumarylowego. Powstają z nich monomery – guajacyl (G), syringyl (S) oraz p-hydroksyfenyl. Rycina 2 przedstawia szlaki biosyntezy tych związków. Monomery ligniny są syntetyzowane w cytoplazmie (w aparacie Golgiego lub ER) i transportowane w pęcherzykach do ścian komórkowych jako monolignole lub glukozydy. Najważniejsze enzymy zaangażowane w biosyntezę monolignoli to: syntaza 4-kumaroiloCoA (4CL), O-metylotransferaza kwasu kawowego/kwasu 5-hydroksyfenolowego (COMT), reduktaza hydroksycynamoiloCoA (CCR) i dehydrogenaza alkoholu hydroksycynamonowego (CAD). Nowo zsyntetyzowane monolignole są następnie transportowane do ściany komórkowej, gdzie przy udziale zlokalizowanych tam enzymów ulegają polimeryzacji (Eckert i in. 2019).

Skład lignin różni się w zależności od typu tkanki i komórki, warstwy ściany komórkowej, a przede wszystkim od gatunku rośliny. Przykładowo u drzew liściastych polimery ligniny zawierają podjednostki G, S i H, natomiast u iglastych występują przede wszystkim monomery G z niewielką domieszką H (De Meester i in. 2022).

W polimeryzacji monolignoli biorą udział enzymy znajdujące się w ścianach – peroksydazy i oksydazy (w tym lakazy). Oksydazy działają we wczesnych stadiach lignifikacji, a peroksydazy w późniejszych, co pozwala na uniknięcie toksycznego efektu nadtlenu wodoru przed zakończeniem apoptozy komórek ścian. Nie wiadomo jednak, czy zestaw enzymów w ścianie zmienia się w zależności od zapotrzebowania na konkretny typ ligniny. Dokładna rola tych enzymów w omawianym procesie wymaga szczegółowych badań ultrastrukturalnych.

Lignifikacja zazwyczaj rozpoczyna się w blaszce środkowej, następnie rozszerza się na ściany wtórne w pierwszej kolejności w rogach komórek (ang. *cell corners*). Następnie ma miejsce apoptoza i utrata protoplastu komórek. W ksylemie kontrola lignifikacji ma miejsce w poszczególnych cewkach (Donaldson i in. 1992).

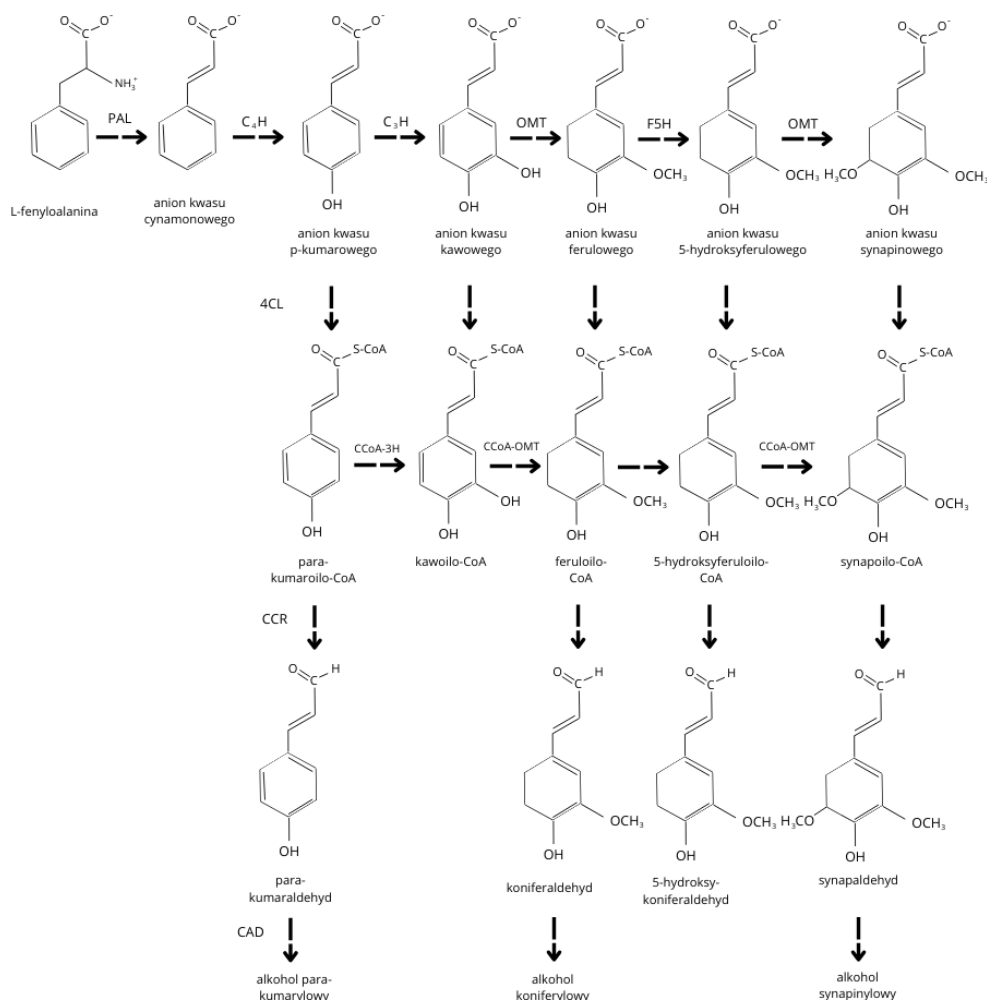
U sosny lignifikacja zachodzi w trzech etapach:

- rogi komórek i blaszka środkowa po uformowaniu warstwy S1;
- powolna lignifikacja podczas formowania ściany wtórnej;
- ostateczna lignifikacja po uformowaniu warstwy S3. (Terashima i in. 1988).

W lignifikacji biorą udział prawdopodobnie również białka należące do ekstensyn i białka bogate w prolinę (Bao i in. 1992 i Muesel i in. 1997). Lignifikacja zachodzi nieco inaczej w blaszce środkowej, ścianie pierwotnej oraz wtórnej. W ścianie pierwotnej i blaszce nowe cząsteczki lignin powstają losowo w obrębie macierzy ściany, natomiast w ścianie wtórnej układ jest bardziej zorganizowany i tworzone są wydłużone struktury na podstawie sieci mikrofibril w konkretnym regionie ściany.

Efekty procesu lignifikacji u roślin są często trudne do przewidzenia ze względu na to, że proces ten polega wielowymiarowej regulacji na kilku istotnych etapach, m.in. na etapie transkrypcji). Istnieją liczne gałęzie przemysłu bazujące na wykorzystaniu surowców pochodzenia drzewnego i w wielu przypadkach obecność ligniny jest przeszkodą w przetwarzaniu drewna dla pozyskania celulozy czy prostych węglowodanów. Z tego względu prowadzone są badania poszukujące możliwości uzyskania wyselekcjonowanych genotypów drzew, które charakteryzują się zmniejszoną zawartością ligniny. W tym celu stosowane są metody inżynierii genetycznej, m.in. CRISPR-Cas9, RNAi, regulatory transkrypcji. Zawartość ligniny u drzew po takich zabiegach jest zależna od wieku drzewa, jak również od tego, czy eksperyment został przeprowadzony w warunkach naturalnych, czy w szklarni. Różne rodzaje czynników stresowych działających na rośliny w naturze są przyczyną zwiększonej produkcji ligniny pomimo zmienionego genotypu. Stosowanie inżynierii genetycznej dla otrzymania pożądaných genotypów często wiąże się jednak ze spadkiem ilości uzyskanej biomasy (De Meester i in. 2022).

Dość oczywisty jest fakt, że u drzew, u których obserwowano spadek aktywności niektórych enzymów uczestniczących w lignifikacji, zawartość ligniny była niższa, zmieniał się też jej skład (Wang et al. 2018). Zmiany ekspresji związanych z polimeryzacją monolignoli genów, takich jak *LAC14*, także wydają się mieć wpływ na skład oraz ilość ligniny w ścianach komórkowych (Qin et al. 2020). Wykazano również, że nadekspresja specyficznych miRNA (miR828) u topoli powoduje hamowanie ekspresji genów związanych z lignifikacją i w rezultacie zmniejsza zawartość ligniny w ścianach komórkowych (Wang i in. 2022).



Ryc. 2. Szlaki biosyntezy monomerów ligniny. Na podstawie: Whetten i Sederoff 1995.

1.3.5 Białka

Białka ściany komórkowej roślin cechują się dużą różnorodnością strukturalną i funkcjonalną, odzwierciedlającą złożoność samej ściany komórkowej jako dynamicznej struktury uczestniczącej w wzroście, rozwoju i odpowiedzi na stresy środowiskowe. Do najważniejszych grup białek ściany należą glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę (HRGP), w tym ekstensyny, białka bogate w prolinę (PRP), białka bogate w glicynę (GRP) oraz glikoproteiny arabinogalaktanowe (AGP). (Cassab 1998, Zhang i in. 2000). Z wyjątkiem GRP, większość tych białek jest glikozylowana i zawiera hydroksyprolinę, a także charakteryzuje się obecnością wysoce powtarzalnych sekwencji aminokwasowych. Białka te pełnią głównie

funkcje strukturalne, uczestnicząc w usztywnianiu ściany komórkowej poprzez sieciowanie międzycząsteczkowe (np. poprzez mostki izodityrozynowe w ekstensynach), ale również biorą udział w morfogenezie, komunikacji międzykomórkowej, a także w odpowiedzi na czynniki stresowe czy atak patogenów. Na przykład AGP są białkami łatwo rozpuszczalnymi, często obecnymi w przestrzeni pozakomórkowej i przypisuje im się rolę w interakcjach komórka–komórka, szczególnie podczas rozwoju. Ekstensyny z kolei tworzą sztywne struktury w ścianie pierwotnej, przyczyniając się do zatrzymania wzrostu komórki i zwiększenia wytrzymałości mechanicznej (np. w kambium i sklerenchymie). PRP i GRP są często lokalizowane w tkankach przewodzących i mogą odgrywać rolę w różnicowaniu ksylemu i lignifikacji (Cassab 1998).

Oprócz białek strukturalnych, w ścianie komórkowej obecne są także enzymy, które odgrywają kluczową rolę w jej przebudowie, usztywnianiu oraz odpowiedzi na stres. Do takich enzymów należą między innymi peroksydazy, które uczestniczą w sieciowaniu białek, lignifikacji oraz reakcji obronnej. Znaczenie peroksydaz w procesie wzrostu i modyfikacji ściany komórkowej zostało szeroko opisane w literaturze.

1.3.6 Rola peroksydaz w procesie wzrostu ścian komórkowych

Peroksydazy to enzymy na podstawie mechanizmu działania zaliczane do klasy oksydoreduktaz. Są zbudowane w większości z centralnej grupy prostetycznej (koenzymu) w postaci hemu, połączonego z częścią białkową (apoenzymem) (Pawłowska i Treder 2014). Podział peroksydaz ze względu na pochodzenie i budowę wyróżnia 3 klasy. U roślin występują dwa rodzaje peroksydaz – peroksydazy klasy I, które działają wewnątrz komórki, oraz peroksydazy klasy III występujące w obrębie ścian komórkowych.

Kluczową rolę peroksydaz klasy III jest usztywnienie ścian komórkowych i hamowanie wydłużania komórek. Peroksydazy zmniejszają elastyczność ścian przez formowanie wiązań między polimerami ścian, takimi jak glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę, pektyny czy hemicelulozy. Zwiększa to usieciowanie ścian i je usztywnia. Aktywność peroksydaz w ścianach zależy od pH oraz zmienia się wraz ze wzrostem hipokotyli (kiedy aktywność wzrasta, wydłużanie hipokotyli staje się mniej intensywne, co potwierdza rolę peroksydaz w tym procesie) (Sánchez i in. 1995).

U sosny zbadano aktywność peroksydaz (12-letnie i 6-letnie drzewa). Wykryto 11 izoenzymów, najwięcej w obrębie bielu, ale również w strefie przejściowej, a nawet w tkance

twardzieli odnotowano aktywność peroksydaz. W drewnie młodym największa aktywność tych enzymów wystąpiła pod koniec sezonu wegetacyjnego, jednak udział poszczególnych izoenzymów nie zmieniał się w ciągu sezonu. Wysoką aktywność zmierzono w obrębie jamek oraz w ścianach komórek miękiszowych promieni (Fagerstedt i in.1998).

1.3.7 Rola nadtlenu wodoru w procesie wzrostu ścian komórkowych

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest dynamicznym związkiem niezbędnym podczas wielu reakcji w komórkach roślinnych. Bierze udział między innymi w procesie biosyntezy ligniny i lignifikacji ścian zachodzącej z udziałem peroksydaz. U niektórych roślin (np. *Pinus halepensis*, *Populus alba*) wykazano, że nadtlenek wodoru nie tylko może być magazynowany w tkance ksylemu w trakcie lignifikacji, ale również zachodzi tam jego biosynteza (Barceló 1998).

Regulacja wzrostu roślin związana jest z powstawaniem mostków difenylowych między składnikami pektynowymi ściany komórkowej, w wyniku działania apoplastycznych peroksydaz wykorzystujących nadtlenek wodoru w roli akceptora elektronów. Peroksydazy redukują nadtlenek wodoru pobierając elektrony z różnych cząsteczek donorowych, wśród których można wyróżnić związki fenolowe czy wtórne metabolity (Passardi i in. 2004). Nadmiar nadtlenu wodoru jest usuwany przez antyoksydanty, takie jak askorbinian. Kwaśne pH w ścianach komórkowych powoduje rozluźnienie ich struktury i umożliwia wzrost, który na poziomie hormonalnym jest kontrolowany m.in. przez auksyny. Udowodniono, że procesy te mogą być hamowane przez nadtlenek wodoru, dlatego jest on bardzo istotnym czynnikiem regulującym wzrost komórek i sztywność ścian (Pedreira i in. 2004).

Wykazano, że wyższe stężenia nadtlenu wodoru pojawiają się w różnych organach u różnych gatunków roślin, jak również mogą być charakterystyczne dla konkretnych typów komórek.

1.4. Czynniki wpływające na przebieg procesu ksylogenezy

Średnica przekroju cewek, grubość ścian komórkowych i inne cechy morfologiczne powstających elementów przewodzących są wypadkową działania czynników wewnętrznych

(w tym genetycznych) oraz środowiskowych. Istnieją dwie teorie – teoria rozwojowa stawia na pierwszym miejscu wewnętrzną regulację procesów fizjologicznych zachodzących w roślinach (w tym formowania drewna). W sprzeczności z nią stoi teoria środowiskowa, według której to czynniki zewnętrzne bezpośrednio lub poprzez wewnętrzną sygnalizację wpływają na wzrost i rozwój roślin. Najnowsze wyniki badań wskazują, że nie można jednoznacznie określić, który z tych czynników odgrywa dominującą rolę, ponieważ rozwój roślin przebiega w wyniku złożonych i wzajemnie powiązanych mechanizmów fizjologicznych oraz środowiskowych (Cuny i Rathgeber 2016).

1.4.1 Gatunek i odmiana

Gatunek i odmiana rośliny mogą mieć wpływ na zróżnicowanie ekspresji genów powiązanych z procesem formowania tkanki drzewnej. Przykładowo u pięciu wybranych odmian topoli w obrębie różnicującego się ksylemu wykazano różnice w ekspresji ponad 10 tysięcy genów, z których większość jest zaangażowana w proces lignifikacji ścian komórkowych oraz PCD (Zhang i in. 2020). Ekspresja genów takich jak *VND*, *SND*, *WND*, *MYB46*, *MYB83*, *MYB4* czy *MYB61* była znacznie wyższa u odmiany *Populus deltoides* 'Danhong' wykazującej największą grubość ścian komórkowych ze wszystkich badanych odmian topoli, co potwierdza przypuszczenie, że etap transkrypcji jest kluczowy w determinowaniu ostatecznej struktury ścian komórkowych drewna.

1.4.2 Hormony roślinne

Hormony roślinne najsilniej związane ze wzrostem tkanek to auksyny i cytokiny. Ciągły przepływ auksyn od liści do korzeni może być istotny dla powstawania kontinuum elementów przewodzących wzdłuż całej łodygi czy pnia (Fukuda 1996, Aloni 2010). Auksyny wraz z cytokininami pełnią też funkcję utrzymania pluripotencjalnej tożsamości komórek prokambium, umożliwiając im nieustanne podziały i różnicowanie w kilku kierunkach rozwojowych (Wojciechowski i in. 2013). U *Pinus sylvestris* poziom IAA zmienia się podczas kiełkowania nasion. W pierwszych stadiach tego procesu dominuje forma związana, a następnie jest on zastępowana przez wolny IAA (Sandberg i in. 1987). W dalszych etapach rozwoju tego gatunku sosny przemieszczanie się auksyn w obrębie strefy kambialnej stymuluje różnicowanie cewek z komórek kambium (Uggla i in. 1996), a u młodych siewek *Pinus pinea* pod wpływem

auksyn i giberelin jest możliwe również odróżnicowanie komórek miękiszowych i przekształcenie ich w elementy przewodzące (Kalev i Aloni 1998). Wykazano, że gradient stężenia auksyn może nadawać kierunek różnicowania powstającym komórkom przewodzącym (Uggla i in. 1996), a fakt ten wspiera teorię mówiącą o tym, że u roślin procesy rozwojowe podlegają przede wszystkim wewnętrznej regulacji, a dopiero w dalszej kolejności zależą od warunków środowiskowych. W przypadku zranienia obejmującego wiązkę przewodzącą przepływ auksyn może omijać zranioną tkankę i przedostawać się niżej poprzez przylegające komórki miękiszu, co stymuluje regenerację tkanek (Aloni 2010).

Gibereliny (GA) pobudzają wzrost i różnicowanie komórek ksylemu. Współdziałanie IAA oraz GA jest niezbędne dla wzrostu elongacyjnego pędu, jak i dla podziałów komórek kambium. Egzogenne GA indukuje proliferację kambium poprzez wpływ na wzrost ekspresji genu *PINI* kodującego białko zaangażowane w transport aktywny IAA (Pizarro i Díaz-Sala 2020, Nguyen i in. 2023).

1.4.3 Warunki środowiska naturalnego i sezonowość

Drzewa, ze względu na osiadły tryb życia, muszą dostosować strukturę swoich tkanek do panujących warunków środowiska, aby zachować ciągłość procesów fizjologicznych. Zadaniem kambium waskularnego jest wytworzenie tkanki przewodzącej jak najlepiej pełniącej swoją funkcję w danych warunkach, zapewniającej nieprzerwany transport wody i asymilatów.

W środowiskach, w których występuje sezonowość warunków klimatycznych aktywność kambium zmienia się w ciągu roku. Prowadzi to do powstania dwóch rodzajów tkanki drzewnej – drewna wczesnego (wiosennego) i późnego (letniego). Charakteryzują się one nieco innymi właściwościami i budową. Przejście kambium w fazę spoczynku lub aktywności jest zależne od temperatury i fotoperiodu, czyli długości dnia w stosunku do nocy. Od wznowienia aktywności kambium na wiosnę rozpoczynają się podziały i różnicowanie komórek w cewki wiosenne, o większym świetle i cienkich ścianach. Zachodzi wtedy aktywnie proces fotosyntezy, co umożliwia ciągły dostęp do węglowodanów jako materiałów budulcowych i komórki kambium dzielą się intensywnie (Nguyen i in. 2023). Na częstość podziałów komórek kambium ma również wpływ dostępność wody – w strefie klimatu umiarkowanego największe opady przypadają na początek sezonu. Po przesileniu letnim, kiedy dzień staje się krótszy, nowe produkty podziału komórek kambium charakteryzują się coraz

grubszymi ścianami i mniejszym światłem, co przekłada się na wyższą gęstość drewna letniego (De Micco i in. 2019). Taki system wzrostu umożliwia rozróżnienie poszczególnych sezonów na podstawie słoików rocznych i określenie wieku ściętego drzewa, jak również zaobserwowanie śladów różnych zdarzeń, które miały miejsce podczas wzrostu drzewa (np. pożar, infekcja, przedłużająca się susza).

Wahania temperatury w ciągu roku mogą przyczynić się do zróżnicowania aktywności podziałowej komórek kambium, a wrażliwość tych komórek na temperaturę jest specyficzna gatunkowo. Oznacza to, że u każdego gatunku szczyt aktywności kambium może przypadać w różnym czasie. Przykładowo u sosny zwyczajnej największa intensywność podziałów prowadzących do powstania komórek ksylemu przypada w maju. U innych gatunków drzew ten szczyt może być opóźniony o parę tygodni. Mierząc takie wartości należy jednak brać pod uwagę, że w przypadku badań prowadzonych w warunkach naturalnych otrzymany wynik może być uzależniony od różnych, współistniejących czynników w danym środowisku (Swidrak i in. 2014). Z tego powodu tak istotne jest równoległe prowadzenie eksperymentalnych badań laboratoryjnych w kontrolowanych warunkach. Idealnym wyjściem byłoby połączenie retrospektywnych badań słoików rocznych u wieloletnich drzew oraz analiz molekularnych podstaw procesu ksylogenezy, aby rozpoznać mechanizmy odpowiedzialne za ostateczną strukturę i właściwości powstającego drewna. Takie interdyscyplinarne podejście badawcze, jakkolwiek kosztowne i pracochłonne, pozwoliłoby na najbardziej kompleksowy wgląd w omawiane zagadnienie.

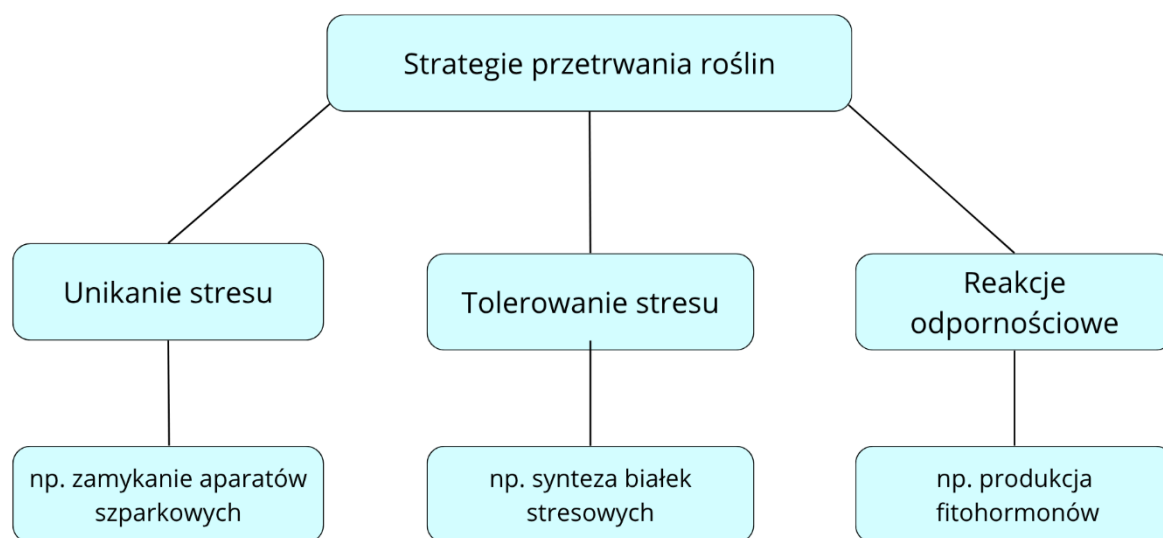
1.4.4 Czynniki stresowe

Rośliny jako organizmy osiadłe, niezdolne do przemieszczania się, są narażone na działanie różnorodnych czynników stresowych. Nie mogąc oddalić się od niekorzystnych warunków, organizmy te muszą się w jakiś sposób do nich przystosować, lub przynajmniej w jak największym stopniu ograniczyć ich niekorzystne działanie. Istnieje wiele strategii, które rośliny stosują, aby poradzić sobie z konsekwencjami wpływu takich czynników na ich fizjologię i przetrwanie. Najważniejsze z nich przedstawione są na ryc.3.

Makroskopowo strategie przetrwania warunków stresowych u roślin możemy podzielić na trzy główne typy: unikanie stresu, tolerowanie stresu i reakcje odpornościowe (Baldi i La Porta 2022). Związane są one ściśle z procesami adaptacji i aklimatyzacji. Adaptacja to przystosowanie ewolucyjne, powstałe w wyniku mutacji genetycznej lub jako efekt zabiegów

hodowlanych. Aklimatyzacja natomiast polega na modyfikacji budowy morfologicznej oraz procesów fizjologicznych osobnika w trakcie ontogenezy i nie podlega dziedziczeniu.

Na poziomie mikroskopowym odpowiedzi roślin na stres obejmują złożone zmiany fizjologiczne i biochemiczne. Należą do nich m.in. zmiany w ekspresji genów, aktywacji enzymów obronnych, produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), fitohormonów oraz białek stresowych. Komórki roślinne reorganizują swoje struktury, takie jak błony komórkowe czy chloroplasty, by ograniczyć uszkodzenia i przywrócić homeostazę. Coraz więcej badań wskazuje także, że niektóre z tych odpowiedzi mogą być modulowane przez zjawiska kwantowe, takie jak koherencja czy tunelowanie – zwłaszcza w procesach związanych z fotosyntezą, reakcjami enzymatycznymi czy percepcją światła i pól magnetycznych (Maffei 2025).



Ryc. 3. Typy strategii przetrwania roślin w warunkach stresu. Opracowanie własne.

Formowanie drewna jest jednym z procesów, na których przebieg może mieć wpływ obecność w środowisku różnych czynników stresowych. Istnieją dwa typy czynników stresowych, na których działanie narażone są organizmy roślinne – czynniki biotyczne oraz abiotyczne.

Stres biotyczny oznacza przede wszystkim żerowanie roślinożernych zwierząt, powodujące uszkodzenie tkanek roślinnych, ale również infekcje powodowane przez pasożytnicze grzyby, a nawet bakterie. U wielu roślin przerwanie tkanek ksylemu spowodowane zranieniem często pociąga za sobą konieczność odbudowy kambium waskularnego. U drzew iglastych jednak obecność dużej ilości żywicy na powierzchni zranienia wpływa na to, że zazwyczaj odbudowa drewna ma miejsce poprzez podziały komórek w obrębie pozostałości kambium na brzegach rany. Powstaje w ten sposób drewno o niższej wartości użytkowej, charakteryzujące się zaburzoną lignifikacją ścian komórkowych, zawierające nieprawidłowo wykształcone elementy przewodzące (Chano i in. 2015). W pierwszej fazie po zranieniu zwykle następuje indukcja ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres biotyczny, utrudniając inwazję patogenów poprzez otwartą ranę.

Z kolei abiotyczne czynniki stresowe nie są związane z aktywnością innych żywych organizmów, z wyłączeniem tych związanych z zanieczyszczeniem środowiska spowodowanym przez człowieka. Do abiotycznych stresorów zaliczamy deficyt wody (stres suszy), wysokie natężenie światła, zbyt niską lub wysoką temperaturę, niedobory mikro- i makroelementów, zanieczyszczenie powietrza gazami, zbyt wysokie stężenie CO₂ w powietrzu, obecność metali ciężkich lub herbicydów w glebie, zbyt wysokie zasolenie.

1.4.4.1 Stres suszy

Produktywność ekosystemów leśnych jest wyraźnie związana z dostępnością wody. Przedłużające się okresy suszy mogą prowadzić do zamierania drzewostanów na dużych obszarach (Bréda i in. 2006), a w konsekwencji do trudnych do odwrócenia zmian gatunkowych i ekologicznych, jak również zmniejszonej ilości surowców pozyskiwanych z tych obszarów. Prognozowana zmiana klimatu prawdopodobnie będzie miała wpływ na wzrost częstości występowania i intensywności warunków suszy w Europie Środkowej. Chociaż spadek całkowitej sumy opadów od roku 1980 był nieznaczny, temperatura powietrza oraz proces parowania wody do atmosfery (ewapotranspiracja) wzrosły istotnie, prowadząc do bardziej ujemnego bilansu wodnego roślin (Eilmann i in. 2009). Symulacje przeprowadzone w ostatnich latach z użyciem złożonych modeli klimatycznych prognozują występowanie warunków przyczyniających się do zamierania drzew iglastych w różnych strefach klimatycznych. Istotne zatem jest jak najlepsze zrozumienie mechanizmów związanych z odpornością drzew na skutki silnego odwodnienia i wysokiej temperatury, aby umożliwić wyselekcjonowanie populacji

optymalnie przystosowanych do niekorzystnych warunków (McDowell i in. 2015, Baldi i La Porta 2022).

Stres suszy należy do najsilniej działających czynników zaburzających procesy fizjologiczne roślin (Chaudhry i Sidhu 2021). Dowiedziono, że nawet względnie krótki okres występowania warunków stresu suszy ma wpływ na zmniejszenie turgoru komórek, elastyczności ścian komórkowych i w konsekwencji spadek liczby podziałów komórek kambium. Tempo podziałów komórkowych i rozwoju ksylemu jest skorelowane z temperaturą otoczenia, ilością opadów i wilgotnością. Susza może obniżać częstość podziałów zmniejszając ciśnienie turgorowe w komórkach kambium. U roślin drzewiastych aktywność kambium jest niezwykle wrażliwa na deficyt wody. Rośliny w warunkach ekstremalnej suszy są bardziej podatne na uszkodzenia tkanki przewodzącej, na kawitację, oraz na ryzyko deformacji ścian komórkowych. (Quaderi i in. 2019).

Wpływ suszy na proces ksylogenezy jest specyficzny gatunkowo. U drzew wzrost temperatury może powodować zwiększenie lub zmniejszenie średnicy cewek/naczyń w zależności od gatunku. Jedną ze strategii obserwowaną u sosny zwyczajnej w warunkach deficytu wody jest zmniejszenie liczby komórek przyrostów rocznych, a następnie wzrost średnicy elementów przewodzących. (Eilmann i in. 2009). Takie przystosowanie może być związane z próbą kompensacji zmniejszenia powierzchni przyrostu obwodowego i w efekcie spadku powierzchni przewodzącej wodę.

Ekstremalny deficyt wody może powodować powstawanie zniekształconych komórek i fluktuacje gęstości tkanki drzewnej w ciągu roku. U *Pinus pinaster* susza występująca latem powoduje wcześniejsze zakończenie podziałów komórkowych w ksylemie (Vieira i in. 2013). Częstym skutkiem letniej suszy jest powstanie wąskiego pierścienia drewna, co jest związane z redukcją aktywności kambium. Wiosenny deficyt wody może przyczynić się do opóźnienia początku ksylogenezy na wiosnę, jak również do wcześniejszego zakończenia podziałów komórek latem (Liang i in. 2016).

Efektywność pobierania wody przez rośliny zależy nie tylko od jej dostępności w podłożu, ale także od intensywności transpiracji, która jest związana z temperaturą otoczenia i wilgotnością powietrza. Stres suszy pojawia się, gdy w glebie zawartość wody spada poniżej poziomu umożliwiającego roślinie utworzenie ciągłego słupa wody, która może być pobierana i doprowadzana tkanką przewodzącą do każdej komórki organizmu. W warunkach fizjologicznych transpiracja prowadzi do powstania gradientu potencjału wody i działania siły ssącej, która wraz z siłami adhezji i kohezji cząsteczek wody zapewnia ciągłość jej transportu. W warunkach deficytu wody w glebie transport nie może efektywnie zachodzić, dodatkowo

roślina może zamykać aparaty szparkowe broniąc się przed utratą wody, co prowadzi do zmniejszenia transpiracji i jeszcze bardziej osłabia funkcjonowanie układu przewodzącego. W elementach przewodzących pojawiają się pęcherzyki powietrza (embolizm), które przerywają ciągłość strumienia wody i uniemożliwiają jej doprowadzenie do dystalnych gałęzi i korzeni, (Bréda i in. 2006). Podczas suszy rośliny nagonasienne są bardziej narażone na występowanie tego zjawiska niż rośliny okrytonasienne, pomimo bardziej stabilnego systemu przewodzącego u tych pierwszych. Dotyczy to zwłaszcza organów dystalnych, jak igły czy korzenie. Również ze względu na swoją długowieczność oraz strategię przetrwania mrozów (pozostawianie igieł na gałęziach) drzewa iglaste mogą doświadczać w ciągu swojego cyklu życiowego znacznej liczby epizodów suszy (Baldi i La Porta 2022).

Stres suszy może prowadzić do hamowania fotosyntezy i starzenia się liści. Poprzez inhibicję aktywności enzymów fotosyntetycznych i zamykanie aparatów szparkowych dochodzi do zahamowania wzrostu, ze względu na mniejszy dopływ CO₂ i zmniejszenie wiązania węgla oraz zawartości chlorofilu. (Quaderi i in. 2019, Chaudhry i Sidhu 2021). Ponadto zmniejszona dostępność wody powoduje kurczenie się objętości komórek oraz zwiększenie lepkości cytoplazmy, co skutkuje uszkodzeniem enzymów i innych białek odpowiedzialnych za fotosyntezę.

Niektóre źródła wskazują na to, że może nastąpić redystrybucja asymilatów w celu naprawy uszkodzonych tkanek lub przesunięcie równowagi ich wykorzystywania w stronę procesów prowadzących do wzrostu korzenia kosztem wzrostu pędu (Mackay i in. 2019). Zaburzenia w funkcjonowaniu ksylemu prowadzą też bezpośrednio do hamowania wzrostu, ponieważ dostarczanie wody do każdej części rośliny jest niezbędne do prawidłowych podziałów komórkowych i rozwoju tkanek.

Strategie radzenia sobie z odwodnieniem mogą się różnić w zależności od tego, czy występuje pojedynczy epizod ekstremalnej suszy, czy stres utrzymuje się przez dłuższy czas. Przedłużająca się susza prowadzi do wzrostu potencjału osmotycznego soku ksylemowego (większe stężenie rozpuszczonych substancji), a w dłuższej perspektywie do obniżenia średnicy komórek przewodzących, grubości ich ścian komórkowych, opóźnienia formowania się ksylemu i floemu, oraz spadku liczby podziałów komórkowych. Susza może wpływać też na zmniejszenie średnicy jamek, pogrubienie ich ścian i zmniejszenie liczby porów w błonach (Quaderi i in. 2019). Zmniejszenie średnicy komórek oraz pogrubienie ścian może mieć na celu zapobieganie kawitacji. Wraz z niedoborem wody w glebie spada przewodnictwo wody w korzeniu (pasemka Caspary'ego zapobiegają cofaniu się wody z korzenia do gleby). Następuje indukcja kawitacji - spadek ciśnienia i przerwanie strumienia wody w naczyniu

poprzez embolizm, czyli pęcherzyki powietrza (Quaderi i in. 2019). Im mniejsza średnica cewek, tym mniejsze jest ryzyko przerwania strumienia wody. Grubsze ściany zwiększają stabilność systemu. Aby zniwelować niedobór wody pobieranej przez cewki o węższym świetle, ich liczba może się zwiększać. Przeciwdziałanie kawitacji poprzez zmianę struktury ksylemu to jeden z najistotniejszych mechanizmów zapobiegających skutkom stresu wodnego u roślin (Eckert i in. 2019).

Odwodnienie wywołuje także zmiany poziomu fitohormonów. Przede wszystkim kwas abscysynowy (ABA) odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi roślin na stres wodny. W warunkach suszy stężenie ABA gwałtownie wzrasta, szczególnie w liściach i tkankach przewodzących, co prowadzi do zamykania aparatów szparkowych, ograniczenia transpiracji oraz aktywacji szlaków odpowiedzialnych za tolerancję odwodnienia (Cutler i in. 2010; Tardieu i in. 2018). ABA pełni również funkcję sygnału systemowego – produkowany lokalnie w korzeniach, może być transportowany ksylemem do liści, gdzie indukuje zmiany fizjologiczne ograniczające utratę wody. Na poziomie molekularnym ABA reguluje ekspresję genów związanych z ochroną komórek przed stresem, w tym genów kodujących białka osmotycznie czynne, enzymy antyoksydacyjne oraz regulatory lignifikacji ścian komórkowych. Udokumentowano, że ABA może aktywować czynniki transkrypcyjne z rodzin NAC i MYB, które sterują ekspresją genów biosyntezy ligniny, takich jak *CCR*, *C4H*, czy *COMT*, przyczyniając się do pogrubienia ścian komórek ksylemu i zwiększenia ich odporności na kawitację (Han i in. 2022). Z tego względu ABA postrzegany jest nie tylko jako regulator gospodarki wodnej, ale również jako mediator przekształceń anatomicznych i metabolicznych w tkankach roślinnych poddanych odwodnieniu. Różnice w warunkach środowiskowych związane z rozmieszczeniem geograficznym mogą również wpływać na zróżnicowanie ekspresji i ewolucji genów związanych z odpowiedzią na stres. Wykazano, że u sosny śródładowej *Pinus banksiana* doszło do pozytywnej selekcji genów związanych z metabolizmem ABA, w przeciwieństwie do gatunków takich jak *P. taeda*, *P. palustris* czy *P. kesiya* var. *langbianensis*, co sugeruje adaptacyjne różnice w odpowiedzi molekularnej pomiędzy gatunkami (Zhao 2018).

W odpowiedzi na stres suszy rośliny aktywują szereg mechanizmów molekularnych i biochemicznych, które pozwalają im przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe. Jednym z kluczowych procesów jest akumulacja osmoprotektantów — małych, niejonowych cząsteczek organicznych, takich jak prolina, N,N,N-trimetyloglicyna, trehaloza czy mannitol. Te związki pełnią funkcję kompatybilnych osmolitów, stabilizując struktury białek i błon

komórkowych, a także regulując potencjał osmotyczny komórek, co umożliwia utrzymanie turgoru i aktywności enzymatycznej nawet przy znacznym odwodnieniu .

Oprócz osmoprotektantów, rośliny syntetyzują również specyficzne białka stresowe, takie jak dehydryny, należące do grupy II białek LEA (Late Embryogenesis Abundant). Dehydryny są wysoce hydrofilowe i termostabilne, co pozwala im pełnić rolę molekularnych chaperonów, chroniąc inne białka przed denaturacją oraz stabilizując struktury błon komórkowych poprzez wiązanie się z lipidami . Ich ekspresja jest indukowana nie tylko przez odwodnienie, ale również przez niskie temperatury i wysokie zasolenie, co świadczy o ich uniwersalnej roli w odpowiedzi na różne stresy abiotyczne. (Liu i in. 2017, Yang i in. 2021).

Badania wykazały, że nadekspresja genów kodujących dehydryny w różnych gatunkach roślin, takich jak tytoń czy pomidor, prowadzi do zwiększenia tolerancji na suszę i inne stresy środowiskowe . Ponadto, dehydryny mogą wiązać jony metali oraz DNA, co sugeruje ich udział w ochronie komórek przed omówionym w dalszej części stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami genetycznymi. (Yang i in. 2021).

Integracja tych mechanizmów — akumulacji osmoprotektantów i syntezy dehydryn — stanowi istotny element strategii adaptacyjnych roślin do warunków suszy, umożliwiając im utrzymanie homeostazy komórkowej i funkcji metabolicznych w obliczu ograniczonej dostępności wody.

1.4.4.2 Stres oksydacyjny

Reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species, ROS) powstają u roślin pod wpływem różnych czynników i są przedmiotem intensywnych badań w ostatnim czasie. Reaktywne formy tlenu, oprócz potencjalnej toksyczności przy wysokich stężeniach, pełnią również istotne funkcje sygnałowe, uczestnicząc w regulacji procesów wzrostu, rozwoju oraz odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. W przypadku nieefektywnego neutralizowania ROS w roślinie rozwija się stres oksydacyjny, który oddziałuje niekorzystnie na cały organizm.

Reaktywne formy tlenu powstają głównie w mitochondriach, chloroplastach i peroksysomach (Labudda 2013). Stres oksydacyjny zaburza liczne procesy fizjologiczne w roślinie, prowadząc m.in. do upośledzenia podziałów komórkowych, osłabienia wzrostu pędów i korzeni oraz przedwczesnego starzenia się tkanek. Reaktywne formy tlenu wpływają negatywnie na integralność struktur komórkowych, zakłócając przepuszczalność błon i

transport substancji. W rezultacie dochodzi do utraty homeostazy komórkowej, co może skutkować ograniczeniem zdolności fotosyntetycznych i oddychania komórkowego. Nadmiar ROS powoduje m. in. uszkodzenia białek, kwasów nukleinowych, peroksydację lipidów błonowych, a nawet denaturację enzymów (Hussain i in. 2019). W przypadku długotrwałego lub silnego stresu oksydacyjnego dochodzi również do aktywacji programowanej śmierci komórki (PCD), co może prowadzić do uszkodzenia lub utraty funkcji całych organów roślinnych. Fotooksydacja wywołana suszą prowadzi do zmniejszenia zawartości chlorofilu, jak również do uszkodzenia białek wchodzących w skład fotosystemów, co powoduje zaburzenia w procesie fotosyntezy (Chaudry i Sidhu 2021).

Jednym z procesów zachodzących w obecności wysokich stężeń reaktywnych form tlenu jest peroksydacja lipidów błonowych. Może być zapoczątkowana przez rodnik hydroksylowy (OH), oraz rodniki: nadtlenkowy (LOO⁻), alkoksylowy (LO⁻) lub alkilowy (L⁻). Również inne reaktywne związki mogą inicjować ten proces, w tym ozon, tlenek i dwutlenek azotu a także dwutlenki siarki i podchloryn. Peroksydacja lipidów jest łańcuchowym procesem utleniania lipidów błonowych, w przebiegu którego uczestniczą wolne rodniki tlenowe. Utleniane są przede wszystkim nienasycone kwasy tłuszczowe i prowadzi to do powstania ich nadtlenków.

Peroksydacja lipidów prowadzi do powstania oksylipin, które mogą wpływać na ekspresję genów o funkcji związanej z sygnalizacją warunków stresowych, w tym czynników transkrypcyjnych (Chmielowska-Bąk i in. 2015).

1.4.4.3 Peroksydazy a warunki stresowe

Niektóre czynniki - zewnętrzne oraz wewnętrzne - mają wpływ na zmianę poziomu aktywności peroksydaz roślinnych. Ogólna aktywność peroksydaz jest jednym z kluczowych markerów określających intensywność warunków stresowych u roślin. U sosny abiotyczne czynniki stresowe, takie jak zanieczyszczenie gleby mogą powodować wzrost ich aktywności (Markkola i in. 2002). W przypadku zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi aktywność tych enzymów może być uwarunkowana rodzajem metalu; dodatkowo może zależeć od tego, czy doświadczenie było przeprowadzone w warunkach naturalnych czy laboratoryjnych (Kukkola

i in. 2000). Z kolei wpływ gazowych zanieczyszczeń powietrza związkami takimi jak SO₂ zależy od stężenia tych związków, jak również od czasu ekspozycji (Katainen i in. 1984). Zewnętrzna ingerencja w integralność tkanek (zranienie) również może pobudzać aktywność peroksydaz, będących istotnym elementem mechanizmów obronnych przed nadmiarem wolnych rodników (Roitto i in. 2003).

Z uwagi na to, że aktywność peroksydaz jest wrażliwa zarówno na zmiany środowiskowe, jak i wewnętrzne wahania hormonalne rośliny (Kieliszewska-Rokicka 1987) pomiar ich aktywności może być stosowany raczej jako miernik reakcji rośliny na dany czynnik, niż jako odzwierciedlenie poziomu samego czynnika w środowisku (Katainen i in. 1984). Peroksydazy stanowią istotne ogniwo łączące reakcję roślin na stres oksydacyjny z procesami ksylogenezy. Enzymy te uczestniczą bezpośrednio w procesie lignifikacji ścian komórkowych, katalizując utlenianie monolignoli i ich polimeryzację w ligninę. Dzięki temu aktywność peroksydaz może odgrywać podwójną rolę: z jednej strony odzwierciedla reakcję rośliny na czynniki stresowe, z drugiej zaś uczestniczy w procesach związanych z przebudową i wzmacnianiem ścian komórkowych podczas różnicowania elementów ksylemu.

1.4.4.4 Anionorodnik ponadtlenkowy

Wiele związków występujących w formie zredukowanej reagując z tlenem ulega jednoelektronowemu utlenieniu. Efektem takiego działania jest powstanie anionorodnika ponadtlenkowego O₂^{•-} i wolnego rodnika reagującego związku:



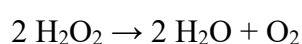
Anionorodnik ponadtlenkowy jest związkiem nietrwałym, ale może uszkadzać centra żelazowo-siarkowe w enzymach, może redukować jony metali, reagować z cysteiną czy ze związkami zawierającymi wiązania nienasycone dając nadttlenki. Co więcej, reaguje też z tlenkiem azotu prowadząc do powstania szkodliwego nadttlenoazotynu.

1.4.4.5 Nadtlenek wodoru

Kluczowym procesem dla powstawania nadtlenu wodoru podczas suszy jest fotooddychanie, a ściślej reakcja utleniania glikolanu. W warunkach deficytu wody powstaje w ten sposób około 70% nadtlenu wodoru, który przy prawidłowo funkcjonującym systemie antyoksydacyjnym i wystarczającej aktywności katalazy w peroksysomach jest w większości usuwany. Istotne są tu jednak również inne czynniki. Stres suszy powoduje zamykanie aparatów szparkowych, co sprzyja akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS – *Reactive Oxygen Species*).

Najważniejsze enzymy biorące udział w detoksykacji H_2O_2 to katalaza, peroksydaza askorbinianowa oraz peroksydaza glutationowa.

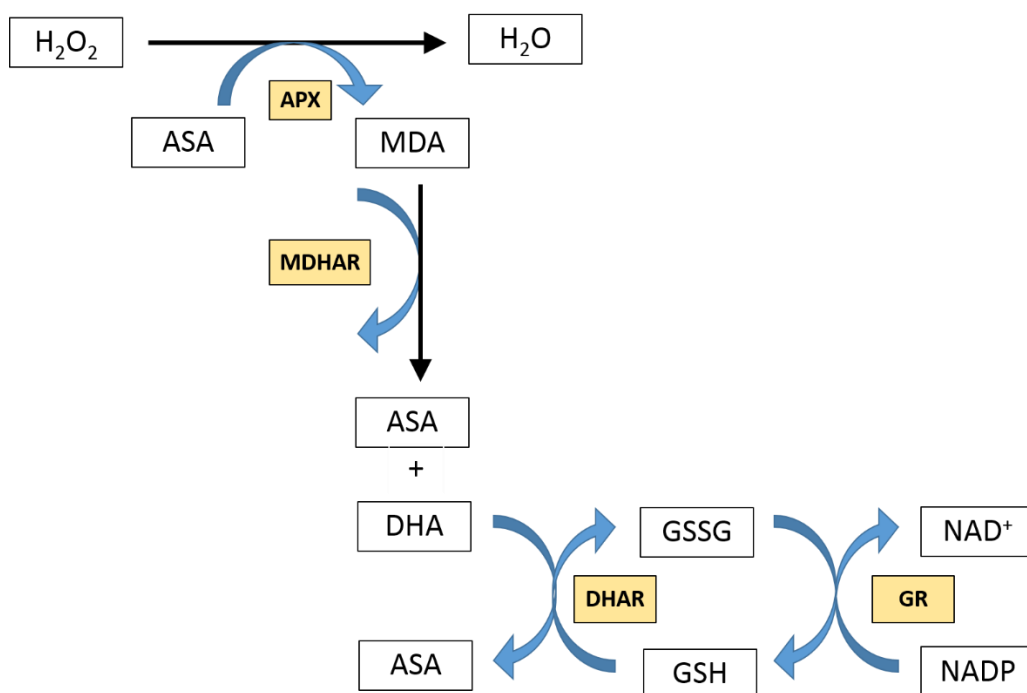
Pierwszy z nich, katalaza (CAT) katalizuje proces rozkładu nadtlenu wodoru do cząsteczki wody i cząsteczki tlenu.



Jest enzymem bardzo wydajnym, rozkłada około 6 milionów cząsteczek H_2O_2 w ciągu jednej minuty (Hussain i in. 2019).

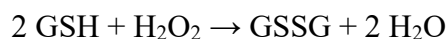
Peroksydaza askorbinianowa (APX) również katalizuje rozkład H_2O_2 , ale w tym przypadku donorem elektronów jest związek ograniczony – askorbinian. Enzym jest zaangażowany w tzw. cykl glutationowo-askorbinianowy, zwany również cyklem Halliwell-Asady. Zachodzi on w cytoplazmie, mitochondriach, plastydach oraz peroksysomach. W cyklu oprócz APX biorą udział trzy inne enzymy: reduktaza monodehydroaskorbinianu (MDHAR), reduktaza dedydroaskorbinianu (DHAR) oraz reduktaza glutationu (GR).

Rycina 4 przedstawia przebieg omawianego cyklu. Składa się on z kilku powiązanych reakcji utlenienia i redukcji. H_2O_2 jest redukowany do H_2O przy jednoczesnym utlenianiu askorbinianu (ASA) do monodehydroaskorbinianu (MDA), który dalej przekształca się w dehydroaskorbinian (DHA). DHA jest następnie redukowany do askorbinianu przy udziale reduktazy dehydroaskorbinianu i utleniana jest cząsteczka glutationu GSH. Powstaje GSSG - utleniona forma tego związku - dimer połączony mostkiem dwusiarczkowym. Ostatecznie GSSG jest redukowany w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową i powstaje ponownie GSH. Donorem elektronu w tej reakcji jest cząsteczka NADPH.



Ryc. 4. Cykl glutationowo-askorbinianowy u roślin. Opracowanie własne na podst. Choudhury i in., 2013.

Peroksydaza glutationowa (GPX) do bezpośredniej redukcji nadtlenu wodoru wykorzystuje glutation (GSH). Jest on tripeptydem zawierającym siarkę. Jeszcze do niedawna aktywność GPX przypisywano głównie komórkom zwierzęcym, dopiero pod koniec XX w. wykryto ich obecność także u roślin. Enzym ten nie jest stale obecny w komórkach roślinnych, jest bowiem syntetyzowany w odpowiedzi na czynnik stresowy. GPX występują głównie w cytoplazmie, chloroplastach, mitochondriach oraz retikulum endoplazmatycznym.



Zbadanie reakcji fizjologicznej rośliny na pojawienie się w otoczeniu konkretnego czynnika stresowego jest utrudnione w warunkach naturalnych, ponieważ jak już wspomniano w naturalnym środowisku organizm rośliny jest poddany działaniu wielu różnych czynników równocześnie. Nie jest zatem możliwe powiązanie zaobserwowanego efektu z pojedynczą przyczyną. Z tego względu tak cenne są badania laboratoryjne wykonywane w kontrolowanych,

standaryzowanych i przede wszystkim stosunkowo wyrównanych warunkach, które zapewniają uzyskanie obiektywnych wyników.

Z uwagi na stabilność i funkcję sygnałową, w niniejszej pracy poziom H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ wykorzystano jako wskaźniki stresu oksydacyjnego.

1.4.5. Odporność na warunki stresu odwodnienia a produktywność drzewostanu

Drzewa iglaste są największą i najbardziej zróżnicowaną klasą w gromadzie roślin nagonasiennych. Są rozpowszechnione na całym świecie i obejmują 615 gatunków (Christenhusz i in. 2011). Według najnowszych danych aż 50% światowej produkcji drewna pochodzi z drzew iglastych. To podkreśla istotną rolę tych gatunków drzew w globalnym sektorze drzewnym.

W świetle prognozowanych zmian klimatycznych coraz istotniejsza staje się hodowla selekcyjna drzew leśnych. Ma ona na celu wytworzenie populacji, które będą jak najlepiej pełniły zaplanowane dla nich funkcje (gospodarcze, społeczne, ekologiczne). Selekcja, czyli uzyskiwanie i wybór najlepiej przystosowanych populacji lub osobników odbywa się poprzez kontrolowane krzyżowanie lub dzięki wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej. Wyłączone drzewostany nasienne powinny posiadać korzystne cechy przekazywane pokoleniom potomnym (Ważyński 2018). Odporność na odwodnienie jest bez wątpienia jedną z takich cech. Przy przeprowadzaniu selekcji pożądanych genotypów należy wziąć też pod uwagę inne potencjalnie korzystne cechy osobnicze, takie jak odporność na niską temperaturę czy zagrożenia biotyczne, ponieważ wyhodowanie populacji odpornej na suszę i jednocześnie wrażliwej na inne warunki miałyoby się z celem hodowli selekcyjnej (Baldi i La Porta 2022).

Reakcje drzew iglastych na odwodnienie obejmują zamykanie aparatów szparkowych, akumulację osmoprotektantów (np. prolina, cukry rozpuszczalne), zwiększoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem ABA. Wspólnym celem tych procesów jest stabilizacja struktury komórkowej i ograniczenie utraty wody. Korzystnym przystosowaniem umożliwiającym przetrwanie warunków stresowych jest plastyczność wzrostu, czyli zdolność drzewa do hamowania tempa procesów wzrostowych w niekorzystnych warunkach i wznowiania ich po ustąpieniu stresu (Baldi i La Porta 2022). Grubość ścian komórkowych jest czynnikiem wpływającym na gęstość drewna, która ma

istotne znaczenie w jego przemysłowych zastosowaniach. Wielkość ta jest kluczowa dla fizycznych, mechanicznych i technologicznych właściwości drewna.

Postęp w dziedzinie transkryptomiki i selekcji wspomaganej markerami molekularnymi umożliwia identyfikację genotypów odpornych na suszę we wczesnych etapach rozwoju roślin. W szczególności, sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) pozwala na szybkie określenie profili ekspresji genów związanych z tolerancją abiotyczną, co może znacząco przyspieszyć proces hodowlany. Ze względu na długowieczność drzew oraz na fakt, że wiele genów odpowiada za cechy odporności roślin na niekorzystne warunki, programy mające na celu uzyskanie łatwo adaptujących się odmian są kosztowne i długotrwałe. Jedynie u kilku gatunków drzew iglastych (*Picea abies*, *Picea glauca*, *Pinus taeda*, *Pinus lambertiana*, *Pseudotsuga menziesii*) udało się zsekwencjonować genom i to nie w każdym przypadku całkowicie. Dane te są jednak bardzo cenne i bardzo przyspieszyły rozwój metod prowadzących do uzyskania wysokiej jakości map genetycznych dla tych gatunków (Neale i Wheeler 2019).

Działania mające na celu udoskonalenie cech użytkowych dotyczą głównie gatunków istotnych gospodarczo, np. sosny taeda (*Pinus taeda*) w Stanach Zjednoczonych, najważniejszej z punktu widzenia pozyskiwania drewna, dla której pierwsze tego typu badania przeprowadzono już w latach 20-tych dwudziestego wieku (Matallana-Ramirez i in. 2021). Choć nacisk ten jest zrozumiały, podkreśla potrzebę zwrócenia większej uwagi na tak ważne ekologicznie taksony, jak Cupressaceae, które wykazują niezwykłą tolerancję na suszę (Baldi i La Porta 2022).

W dobie postępujących zmian klimatycznych odporność drzew na suszę staje się nie tylko pożądaną, ale wręcz kluczową cechą adaptacyjną w strategiach zrównoważonej gospodarki leśnej. Należy przy tym jednak pamiętać, że zwiększona tolerancja na odwodnienie może prowadzić do kompromisów fizjologicznych, takich jak niższe tempo wzrostu czy mniejsza powierzchnia liści, co wpływa na ogólną produktywność drzewostanu. Dlatego w programach selekcyjnych konieczne jest wyważenie tych cech w zależności od przeznaczenia hodowli – np. odporności i stabilności w warunkach skrajnych versus szybki przyrost w korzystnych warunkach. Integracja klasycznych metod hodowlanych z podejściami genomicznymi otwiera nowe perspektywy dla efektywnej selekcji genotypów odpornych na stres abiotyczny, bez rezygnacji z cech użytkowych. W nadchodzących dekadach to właśnie zdolność łączenia odporności środowiskowej z produktywnością może zadecydować o trwałości i funkcjonalności drzewostanów w warunkach nasilającej się presji klimatycznej.

2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

W świetle ostatnich doniesień o ocieplaniu się klimatu susza stała się jednym z najczęściej występujących czynników stresowych wpływających na wzrost i rozwój roślin drzewiastych, nie tylko w rejonach tropikalnych, ale coraz częściej również w strefie klimatu umiarkowanego.

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) jest jednym z najszerzej rozpowszechnionych gatunków lasotwórczych w Europie. (Carvalho i in. 2017).

Celem niniejszej pracy jest określenie intensywności stresu suszy w początkowych fazach rozwoju siewki sosny poprzez oznaczenie poziomu markerów stresowych oraz zbadanie wpływu odwodnienia na ekspresję wybranych genów i procesy fizjologiczne zachodzące podczas formowania tkanki drzewnej (ksylogenezy).

Hipotezy badawcze

H1:

Deficyt wody u siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) prowadzi do istotnego obniżenia względnej zawartości wody w tkankach, co świadczy o skutecznym wywołaniu stresu suszy w zastosowanym modelu doświadczalnym.

H2:

Stres suszy powoduje wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (anionorodnika nadadtlenkowego i nadtlenu wodoru) w tkankach siewek sosny zwyczajnej.

H3:

Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu indukowany stresem suszy prowadzi do nasilonej peroksydacji lipidów błonowych, mierzonej jako wzrost poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).

H4:

Odwodnienie siewek sosny zwyczajnej w początkowych fazach rozwoju prowadzi do istotnych zmian ekspresji genów związanych z procesem ksylogenezy i biosyntezy ściany komórkowej, co może wskazywać na modyfikację przebiegu różnicowania ksylemu w warunkach stresowych.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał roślinny

Używany w doświadczeniach materiał roślinny obejmował nasiona sosny zwyczajnej pochodzące z plantacji Nadleśnictwa Białogard, przechowywane w warunkach odpowiadających normom, w ciemności w temperaturze 20-22°C.



Ryc. 5. Nasiona sosny zwyczajnej przed wysianiem.

Nasiona (ryc. 5) wysiewane były na krążki torfowe Jiffy-7 pH 6 o średnicy 44 mm (po napęcznieniu krążków w sterylnej wodzie destylowanej). Wysiewano po 2 nasiona na jeden krążek. Krążki układano na plastikowych kuwetach (ryc. 6). Następnie nasiona kiełkowały w naturalnym świetle dziennym w pomieszczeniu laboratoryjnym, przy dostępie do światła słonecznego. Fotoperiod był zbliżony do naturalnego cyklu dnia i nocy dla okresu prowadzenia doświadczenia. Temperatura w pomieszczeniu utrzymywała się na poziomie temperatury pokojowej (ok. 20–22 °C). Wszystkie warianty doświadczenia prowadzono w tych samych warunkach środowiskowych. Ze względu na zastosowanie naturalnego oświetlenia nie kontrolowano dokładnego natężenia światła ani długości fotoperiodu, jednak wszystkie rośliny były hodowane równolegle w zbliżonych warunkach środowiskowych. Nasiona były podlewane sterylną wodą destylowaną według zaplanowanego schematu. Po 3 tygodniach od wysiania siewki zbierano w wyznaczonych dniach i przeprowadzano analizy.



Ryc. 6. Hodowla siewek na krążkach torfowych. Z lewej strony siewki kontrolne, z prawej strony po zastosowaniu odwodnienia (dzień 3).

3.2 Schemat doświadczenia

Tabela 1 przedstawia przebieg eksperymentu. Zarówno siewki badane jak i kontrolne były podlewane co drugi dzień sterylną wodą destylowaną, aż do 21 dnia prowadzenia hodowli, w którym zaprzestano podlewania siewek badanych, natomiast w przypadku siewek kontrolnych podlewanie kontynuowano do końca doświadczenia. W dniach 0, 1, 3, 4, 5 licząc od zastosowania warunków stresowych zbierano materiał roślinny do analizy. W dniu 7 po zebraniu materiału siewki badane ponownie nawadniano (rewatering) i w dniu 8 również zbierano materiał z obu wariantów.

Dzień od wysiania	Kontrola	Stres
1-20	Podlewanie co drugi dzień	Podlewanie co drugi dzień
21 (0)	Zebranie materiału Podlewanie do końca doświadczenia co drugi dzień	Zebranie materiału Zaprzestanie podlewania
22 (1)	Zebranie materiału	Zebranie materiału

24 (3)	Zebranie materiału	Zebranie materiału
26 (5)	Zebranie materiału	Zebranie materiału
28 (7)	Zebranie materiału	Zebranie materiału Ponowne nawodnienie (rewatering)
29 (8)	Zebranie materiału	Zebranie materiału

Tab. 1. Schemat doświadczenia.

3.3 Zbieranie materiału

Materiał roślinny zbierano na lodzie na szalce Petriego, dzieląc każdą siewkę na część górną (epikotyl) oraz dolną (hipokotyl i korzeń) i umieszczając 100 mg materiału w probówce Eppendorfa. Próby były wykorzystywane do analizy bezpośrednio po zebraniu (w przypadku badania markerów stresu) lub natychmiast zamrażane w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w temperaturze minus 80°C (w przypadku badań ekspresji genów).

3.4 Przygotowanie preparatów do obserwacji mikroskopowych

Materiał roślinny utrwalany był przez 6 godzin w formalinie, a następnie przeprowadzany przez zmodyfikowany (skrócony) program do obróbki tkanek w procesorze tkankowym Leica HistoCore PEARL (tab. 2). Kostki parafinowe skrawano na mikrotomie saneczkowym Leica SM2010R, wykonywano preparaty mikroskopowe na szkiełkach, po skrojeniu i wysuszeniu przeprowadzono przez szereg ksylenów w celu odparafinowania (3x 1 min.) a następnie przez szereg alkoholi o malejącym stężeniu aż do wody destylowanej. Tak przygotowane preparaty poddawano barwieniu.

Numer stacji	Odczynnik	Czas procesu	Temperatura/ciśnienie/próżnia
1	Alkohol 60%	15 minut	Temp. otoczenia/-/-
2	Alkohol 70%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-
3	Alkohol 80%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-
4	Alkohol 90%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-
5	Alkohol 100%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-

6	Alkohol 100%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-
7	Alkohol 100%	5 minut	Temp. otoczenia/-/-
8	Alkohol/ksylen	10 minut	Temp. otoczenia/-/-
9	Ksylen	10 minut	35°C
10	Ksylen	10 minut	35°C
11	Ksylen	10 minut	39°C
12	Parafina	5 minut	65°C
13	Parafina	5 minut	65°C
14	Parafina	10 minut	65°C

Tab. 2. Program NOC HistoCore PEARL do obróbki tkanek (zmodyfikowany).

Preparaty barwione były 0,05% roztworem błękitu toluidynowego w celu uwidocznienia struktury ścian komórkowych oraz 1,5% roztworem floroglucyny w celu zbadania lignifikacji ścian komórkowych. Do przygotowania roztworów wykorzystano błękit toluidynowy (C.I. 50240) bezwodną floroglucynę oraz kwas solny 35-38% sp. CZ. (wszystkie produkty marki POL-AURA). Zastosowanie programu do obróbki tkanek i odpowiednie utrwalenie materiału umożliwiło otrzymanie wystarczająco cienkich skrawków, mimo to jednak uzyskanie pełnego obrazu z siewek po 7-dniowym stosowaniu suszy okazało się dość wymagającym zadaniem ze względu na dużą wiotkość i kruchość materiału.

Zdjęcia wykonano przy wykorzystaniu mikroskopu ZEISS Axio Scope.A1 należącego do Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Pracownia Patomorfologiczna GPSK). Zastosowano kamerę do rejestracji obrazu AxioCam ER 5s firmy ZEISS.

3.5 Obliczanie względnej zawartości wody (RWC [%])

W celu dokładniejszej oceny poziomu zastosowanych warunków stresowych obliczono względną zawartość wody (relative water content) która określa procentową zawartość wody w tkance roślinnej w odniesieniu do kontroli.

W pierwszej kolejności mierzono świeżą masę 4 siewek z każdego wariantu, a następnie materiał umieszczano w cieplarni w temperaturze 55°C w celu całkowitego odparowania wody.

Po upływie 3-5 dni mierzono suchą masę organów i obliczano RWC [%] według poniższego wzoru:

$$RWC = \frac{FW - DW}{HW - DW} \times 100\%$$

- FW – świeża masa
- DW – sucha masa
- HW – masa w stanie pełnego turgoru (kontrola)

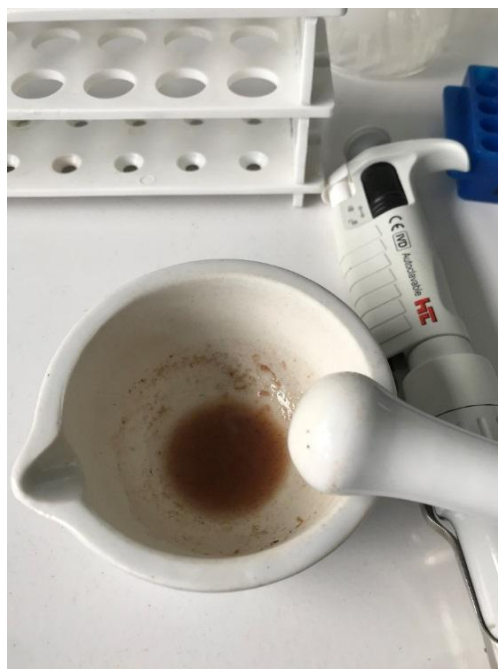


Ryc. 7. Materiał zebrany do analizy zmian świeżej i suchej masy pod wpływem odwodnienia.

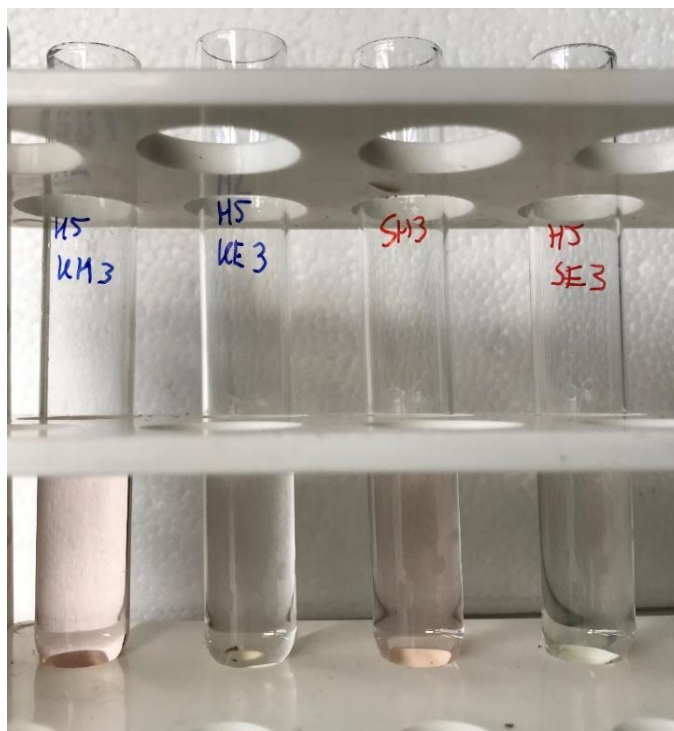
3.6 Pomiar poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym - TBARS

Stopień peroksydacji lipidów to parametr sygnalizujący intensywność stresu oksydacyjnego. Podczas peroksydacji pojawiają się duże ilości charakterystycznych związków, w tym dialdehydu malonowego (MDA), który może być wykryty metodą TBARS, poprzez dodanie kwasu tiobarbiturowego (TBA) do ekstraktów roślinnych.

Próby homogenizowano w wychłodzonym mózdzierzu z dodatkiem 2 ml 10% kwasu trichlorooctowego TCA (ryc.8). Następnie przenoszono do probówek typu Eppendorf i poddawano wirowaniu przez 10 minut przy 12 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przenoszono do szklanych probówek i dodawano 4 ml roztworu TBA (ryc. 9).

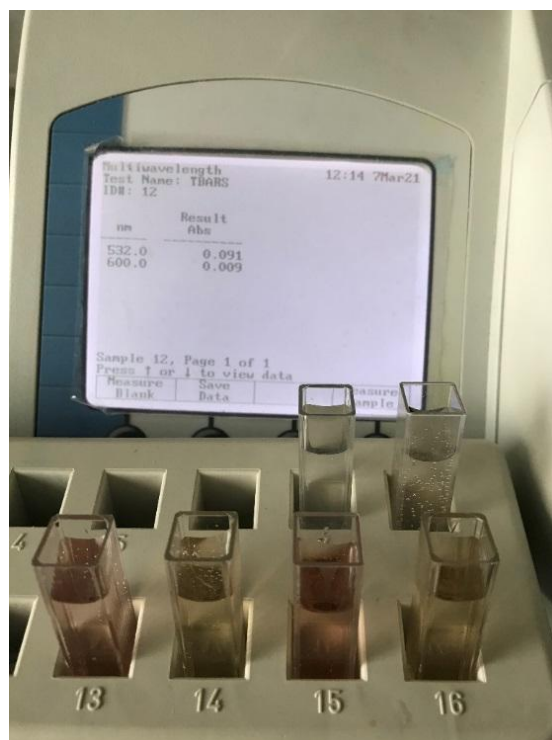
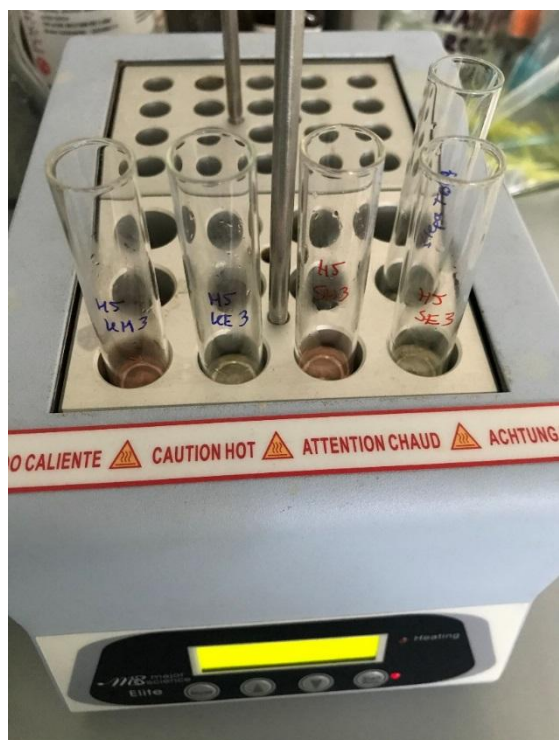


Ryc. 8. Homogenizacja prób w mózdzierzach. Z lewej strony epikotyle, z prawej hipokotyle i korzenie.



Ryc. 9. Próby przed wirowaniem i po dodaniu roztworu TBA.

Następnie próby inkubowano w bloku grzeijnym w temperaturze 95°C przez 30 minut, schładzano na lodzie i mierzono absorbancję w kuwetach plastikowych przy długości fali $\lambda = 532 \text{ nm}$ oraz $\lambda = 600 \text{ nm}$ (ryc. 10). Od absorbancji zmierzonej przy 532 nm odejmowano absorbancję nieswoistych substancji mierzoną przy długości fali 600 nm, a następnie obliczano poziom związków reagujących z TBA ze współczynnika ekstynkcji równego $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Ryc. 10. Z lewej - próby w szklanych probówkach podczas inkubacji z roztworem TBA. Z prawej – spektrofotometryczny pomiar absorbancji.

3.7 Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet -}$ w reakcji z NBT

Poziom anionorodnika ponadtlenkowego jest mierzony wybraną metodą (Doke 1983) na podstawie jego zdolności redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT) do diformazanu, skutkiem czego jest niebieskie zabarwienie.

Najpierw przygotowywano bufor fosforanowo potasowy i ustalano jego pH na 7,8.

- 2.978 g K_2HPO_4
- 0.394 g KH_2PO_4
- 200 ml wody destylowanej

Następnie sporządzano roztwór EDTA (10 mM).

185 mg EDTA + 50 ml wody. ($M_{EDTA} = 372.24 \text{ g/mol}$)

Roztwór rozcieńczano 100 x przed dodaniem do buforu.

Przygotowywano mieszaninę inkubacyjną.

- 0.05 M bufor potasowy pH=7.8
- 0.05% NBT
- 0.1 mM EDTA
- 10 mM NaN₃

20 ml mieszaniny :

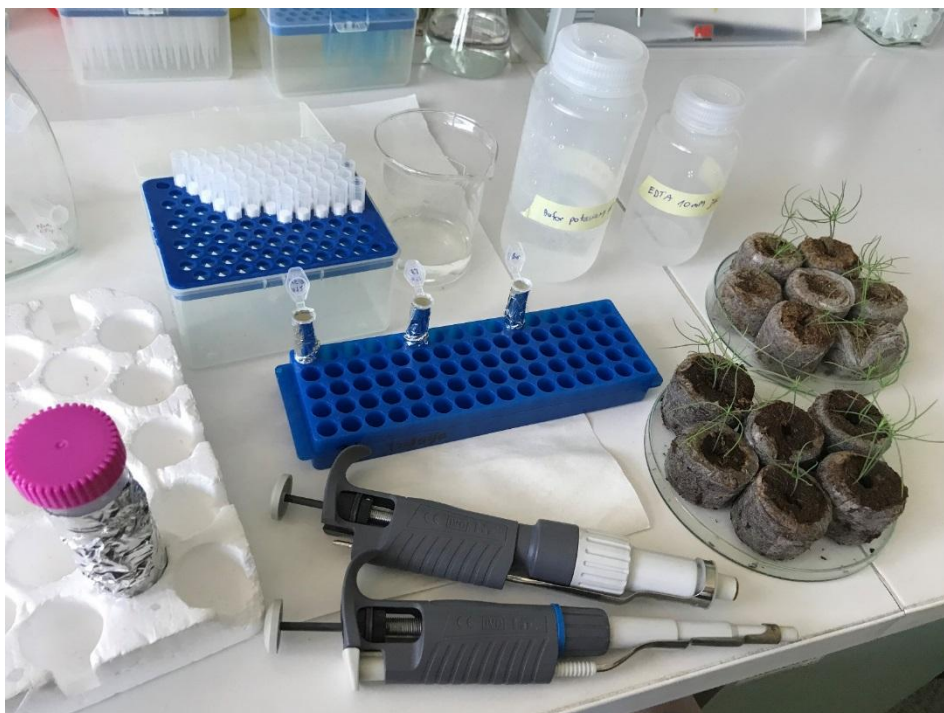
- 10 mg NBT
- 2 ml 1 mM roztworu EDTA (0.1 mM EDTA)
- 13 mg NaN₃
- dopełniano buforem potasowym do 20 ml.

Korzenie podobnej długości odcinano na szalce na lodzie i umieszczano po 5 sztuk w każdej probówce typu Eppendorf (o pojemności 2 ml) zawierającej 2 ml mieszaniny reakcyjnej. Inkubowano przez 1 godzinę w ciemności.

Po tym czasie korzenie osuszano, roztwory po wyjęciu korzeni umieszczano na 15 minut w temperaturze 85 stopni. W tym czasie korzenie ważono, a następnie próby przekładano do lodu na 5 minut.

Po inkubacji mierzono absorbancję przy długości fali 580 nm w kuwetach plastikowych, w roztworze reakcyjnym po usunięciu materiału roślinnego.

Wyniki wyrażano jako absorbancję na gram świeżej masy (FW) korzeni. Wykonano 6 powtórzeń biologicznych.



Ryc. 11. Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$ w reakcji z NBT - przygotowywanie doświadczenia – roztwór inkubacyjny, bufor, próbki i materiał roślinny.

3.8 Pomiar poziomu nadtlenu wodoru H_2O_2

Zawartość H_2O_2 w badanym materiale roślinnym oznaczano metodą kolorymetryczną opartą na reakcji z odczynnikiem tytanowym z pomiarem absorbancji przy odpowiedniej długości fali (508 nm).

1. Materiał roślinny homogenizowano w schłodzonym moździerzu w 0.1 M buforze fosforanowo-potasowym o pH 7.8; (P.inf 100 mg/1.6 ml)
2. Wirowano 13 000 g / 25 min / 4°C
3. Następnie inkubowano mieszaninę reakcyjną w szklanych probówkach przez 10 minut i mierzono absorbancję przy długości fali 508 nm.
4. Mieszanina reakcyjna:
 - 0.1 M bufor P/K (pH 7.8) 600 μ l
 - Ekstrakt 400 μ l
 - Odczynnik tytanowy 500 μ l

Próba ślepa:

- 0.1 M bufor P/K 800 μ l
- Odczynnik tytanowy 500 μ l

Odczynniki:

- Bufor fosforanowo-potasowy
- Odczynnik tytanowy – sporządzony w dniu oznaczeń przez zmieszanie w stosunku 1:1 :

0.6 mM roztworu 4,2 pirydylazo-rezorcyny (PRL)

0,004 g / 25 ml H₂O

0.6 mM roztworu winianu potasowo-tytanowego (PTO)

0,0053 g / 25 ml H₂O

Po rozpuszczeniu PRL i PTO, odczynnik był intensywnie mieszany i umieszczony na lodzie w ciemnej butelce.

Dla każdej serii pomiarowej (dzień 0, 1, 3, 5, 7, 8) sporządzano osobną krzywą standardową, przygotowaną na podstawie roztworów wzorcowych H₂O₂ o znanych stężeniach (1,25; 2,5; 5; 10 μ M). Dla każdego stężenia mierzono absorbancję spektrofotometrycznie, a następnie stosowano równanie regresji liniowej typu:

$$y = ax + b$$

gdzie:

y – zmierzona absorbancja,

x – stężenie H₂O₂ [μ M].

Na podstawie uzyskanych równań regresji obliczano stężenie H₂O₂ w próbkach badanych, podstawiając zmierzoną absorbancję do przekształconego wzoru:

$$x = \frac{y - b}{a}$$

Aby uzyskać wartość wyrażoną w przeliczeniu na masę próbki, absorbancję każdej próbki przeliczano na jednostkę świeżej masy. Wyniki wyrażano w jednostkach: $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}$ świeżej masy.

Dla każdej próby wykonano siedem powtórzeń biologicznych. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ błąd standardowy.

Krzywa standardowa

1. Przygotowywano roztwór 1 mM H_2O_2

10 μl H_2O_2 (stężenie 30%) / 100 ml H_2O $\longrightarrow$ 1 mM H_2O_2

2. Rozcieńczano roztwór 10x

1 ml (1 mM) H_2O_2 + 9 ml H_2O $\longrightarrow$ 100 μM H_2O_2

3. Z rozcieńczonego roztworu przygotowywano serię dalszych rozcieńczeń.

- 150 μl (10 μM)
- 75 μl (5 μM)
- 38 μl (2,5 μM)
- 19 μl (1,25 μM)

	10 μM	5 μM	2,5 μM	1,25 μM
H_2O_2 (100 μM)	150 μl	75 μl	38 μl	19 μl
Bufor P/K	850 μl	925 μl	962 μl	981 μl
Odczynnik tytanowy	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl

Tab. 3. Krzywa standardowa dla nadtlenu wodoru

3.9 Izolacja RNA

Izolację RNA przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników Universal RNA Purification Kit marki EURx[®] (nr kat. E3598-02). W celu zwiększenia wydajności homogenizacji materiału dodatkowo zastosowano probówki Tissue Grinding Tool (EURx[®], nr kat. E0359-04) oraz bufor Lyse Buffer PVP (EURx[®], nr kat. E0291-01).

Procedura izolacji obejmowała następujące etapy:

1. Przygotowanie buforów:

Lyse Buffer PVP – do każdego 1 ml buforu dodano po 10 µl β-merkaptetanolu

Bufor RL – do każdego 1 ml buforu dodano po 10 µl β-merkaptetanolu

2. Po umieszczeniu materiału w probówkach do homogenizacji (100 mg/probówka) dodano 200 µl buforu Lyse Buffer i 100 µl buforu RL.
3. Rozcierano przez 2 minuty przy pomocy plastikowych patyczków w probówkach ze złożem ścierającym.
4. Wirowano przez 4 minuty przy 12 000 rpm.
5. Przenoszono supernatant do nowych probówek typu Eppendorf (2 ml). Osad wyrzucano.
6. Inkubowano na lodzie 10 minut.
7. Wirowano przez 4 minuty przy 12 000 rpm.
8. Przenoszono supernatant do nowych probówek typu Eppendorf (2 ml).
9. Dodawano 200 µl buforu RL.
10. Dokładnie mieszano przez pipetowanie.
11. Ostrożnie przenoszono supernatant (maksymalnie 650 µl) do mikrokolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2-mililitrowej probówce odbierającej.

12. Wirowano przez 2 minuty przy 12 000 rpm (wirowanie filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje większość DNA).
13. Do przesączu dodawano 0,6 obj. alkoholu etylowego (96-100%). Mieszano dokładnie przez pipetowanie.
14. Przenoszono mieszaninę (razem z osadem) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej.
15. Wirowano przez 1 minutę (11 000 g).
16. Wylewano przesącz.
17. Dodawano 400 µl buforu płuczącego Wash DN1 do minikolumny.
18. Wirowano przez 1 minutę (11 000 g). Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA, jednak w celu uzyskania maksymalnej czystości RNA dodatkowo trawiono preparat DNazą w późniejszych etapach).
19. Wyjmowano minikolumnę, wylewano przesącz i ponownie umieszczano minikolumnę w probówce.
20. Dodawano 600 µl buforu płuczącego Wash RBW do minikolumny.
21. Wirowano przez 1 minutę (11 000 g).
22. Wyjmowano minikolumnę, wylewano przesącz i ponownie umieszczano minikolumnę w probówce.
23. Dodawano 300 µl buforu płuczącego Wash RBW do minikolumny.
24. Wirowano przez 2 minuty (11 000 g).
25. Wylewano przesącz i minikolumnę umieszczano w nowej probówce typu Eppendorf.
26. Dodawano 30 µl RNase-free water centralnie na membranę.

27. Wirowano przez 1 minutę (11 000 g).

28. Minikolumnę usuwano, zamykano probówkę i po zmierzeniu ilości oraz określeniu czystości RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Ilość i czystość otrzymanego RNA określano spektrofotometrycznie przy wykorzystaniu spektrofotometru UV-Vis IMPLEN NanoPhotometer® N60. Wymagana czystość RNA w przypadku tego urządzenia to >2.0 (ratio 260/280 nm).

3.10 Usuwanie DNA i odwrotna transkrypcja

Usuwanie DNA

W celu usunięcia pozostałości DNA przeprowadzano reakcję trawienia DNazą (DNase I RNase-free marki EURx®, nr kat. E1345-01).

Mieszanina reakcyjna zawierała:

- 8 µl roztworu RNA (1 µg RNA rozpuszczony w RNase-free water)
- 1 µl buforu 10x Reaction Buffer I (w zestawie)
- 1 U RNase-free DNase I

Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl.

Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, następnie dodawano 1 µl 200-µM roztworu EDTA i inkubowano przez 10 minut w 65°C w celu zatrzymania reakcji.

Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu smART First Strand cDNA Synthesis Kit marki EURx® (nr kat. E0804-02).

Do probówki dodawano:

- 1 µg RNA w RNase-free water

- 1 μ l starterów Oligo (dT)₂₀ (50 μ M)
- 1 μ l 10 mM dNTPs mix
- RNase-free water – uzupełniano do objętości **12,5 μ l**.

Następnie dodawano:

- 4 μ l 5x cDNA Buffer
- 2 μ l DTT 0,1 M
- 0,5 μ l RNase Inhibitor (50 U/ μ l)
- 1 μ l smART (200 U/ μ l) – odwrotna transkryptaza

Końcowa objętość mieszaniny – **20 μ l**.

Probówki przenoszono do termocyklera i inkubowano 60 minut w temperaturze 50°C.

Reakcję przerywano przez 5-minutową inkubację w 85°C.

W przedstawionym doświadczeniu nie wykonywano kontroli –RT (bez odwrotnej transkryptazy); jednak zastosowanie etapu trawienia DNazą miało na celu minimalizację obecności DNA genomowego w próbkach.

3.11 Real-Time qPCR

Metoda Real-Time qPCR polega na ilościowym oszacowaniu ilości produktu amplifikacji w każdym cyklu reakcji, czyli powstający produkt monitorowany jest w czasie rzeczywistym. Wymaga dobrania odpowiednich warunków reakcji (temperatura, skład mieszaniny reakcyjnej) oraz metody analizy danych. Do pomiarów ekspresji genów wykorzystano aparat LineGene 9660 (BIOER, Chiny) wraz z dedykowanym oprogramowaniem producenta.

Badane geny wybrano na podstawie znalezionych w literaturze informacji o ich potencjalnym udziale w odpowiedzi roślin na stres suszy lub w procesie ksylogenezy, biorąc pod uwagę dostępność sekwencji nukleotydowych w bazie danych NCBI. Ponieważ dla

gatunku *Pinus sylvestris* w czasie wykonywania badań istniała niewielka grupa interesujących sekwencji, w kilku przypadkach zastosowano startery zaprojektowane dla sekwencji innych, spokrewnionych gatunków. Wybór takich starterów był możliwy dzięki wysokiemu stopniowi konserwacji analizowanych sekwencji w obrębie rodzaju *Pinus* oraz innych gatunków roślin nagonasiennych.

Sekwencje starterów stosowanych w reakcji Real-Time qPCR projektowane były przy użyciu narzędzia Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Oligonukleotydy syntetyzowane były w firmie Syngen Biotech sp. z o.o. zgodnie z zamówieniem (tabela 4).

Numer w bazie NCBI	Gatunek	Startery - sekwencja	Kodowane białko
KM496532	<i>Pinus massoniana</i>	ACGGTTGTAACCTTCGGTCC TTGTCACCGGGTAATGCCTC	EF-1A
GQ339779	<i>Pinus sylvestris</i>	TATTGTGCTCAGTGGCGGTT CCTTTCTGGAGGTGCAACCA	aktyna
MW116836.1	<i>Pinus sylvestris</i>	GCAAGAAGGCAGAAGACGGA TGGTGCTCTACTCCATGCTC	Dehydryna DHN-1
AF119225.1	<i>Pinus radiata</i>	TGGAAGTGTACCTTCGCGTT GGAGATTCAGTGGGCAGCTT	COMT
KY807684.1	<i>Pinus radiata</i>	ATGTCTTTGGTGGAGCCGAG AGTTCTGGCAAGCCTTTGGT	PIN1
DQ657212.1	<i>Pinus taeda</i>	TCGGCGACTGGATGTTTTGA AGGCTGCCATCTTCCAACAA	HD-ZIP III (HDZ33)

Tab. 4. Sekwencje starterów z bazy danych NCBI dla wybranych genów.

Reakcje Real-Time qPCR prowadzono w objętości 25 μ l przy użyciu zestawu SG/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$). Mieszanina reakcyjna zawierała: 12,5 μ l SG/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$), startery specyficzne dla danego genu (stężenie końcowe 0,5 μ M każdy), 1 μ l rozcieńczonej 5x matrycy cDNA oraz wodę wolną od nukleaz do objętości końcowej 25 μ l.

Po zakończeniu amplifikacji przeprowadzano analizę krzywej topnienia (melt curve) w celu weryfikacji specyficzności produktów amplifikacji.

Efektywność reakcji dla zastosowanych par starterów mieściła się w zakresie akceptowanym dla analiz qPCR.

W celu normalizacji wyników ekspresji badanych genów zastosowano dwa geny referencyjne: gen kodujący aktynę oraz elongacyjny czynnik translacyjny EF1 α . Analiza stabilności ekspresji wykazała, że oba geny wykazywały zbliżony wzór ekspresji, jednak EF1 α charakteryzował się mniejszymi wahaniami poziomu transkryptu pomiędzy próbkami w porównaniu do aktyny. Ze względu na wyższą stabilność ekspresji, do dalszych analiz danych ilościowych wykorzystano EF1 α jako główny gen referencyjny.

Względną ekspresję genów obliczano metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Wartości ΔCt wyznaczano jako różnicę pomiędzy Ct genu badanego i genu referencyjnego EF1 α . Następnie obliczano $\Delta\Delta Ct$ jako różnicę pomiędzy średnią wartością ΔCt dla próbek stresowych i kontrolnych w danym dniu doświadczenia.

3.12 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie OriginPro 2023. Do oceny istotności różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi a poddanymi stresowi w poszczególnych dniach wykorzystano test Manna–Whitneya (dla danych niespełniających założeń testu t-Studenta). Za istotne statystycznie uznawano różnice przy wartości $p < 0,05$. Analizy przeprowadzano oddzielnie dla każdego dnia doświadczenia. Ze względu na wielokrotność porównań wyniki interpretowano z uwzględnieniem tego ograniczenia analizy. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD (odchylenie standardowe) dla określonej liczby powtórzeń biologicznych.

Odchylenie standardowe wyliczano przy użyciu funkcji ODCH.ST.PRÓBK w programie Excel, według wzoru:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Liczba powtórzeń biologicznych była różna w zależności od rodzaju analizy. W oznaczeniach poziomu H_2O_2 wykorzystano $n = 7$ powtórzeń biologicznych, w analizie TBARS $n = 4$, w oznaczeniu anionorodnika ponadtlenkowego metodą NBT $n = 6$, natomiast w analizie ekspresji genów metodą qPCR $n = 3$ powtórzenia biologiczne. Każdą próbę w qPCR analizowano w dwóch powtórzeniach technicznych.

4. WYNIKI

Wykresy w poniższych podrozdziałach przedstawiają średnie wartości $\pm$ SD dla określonej liczby powtórzeń biologicznych (n podano w podpisach rycin). Istotność różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi i poddanymi stresowi oceniano testem Manna–Whitneya dla każdego dnia doświadczenia oddzielnie, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wartości p podano w tekście lub podpisach rycin.

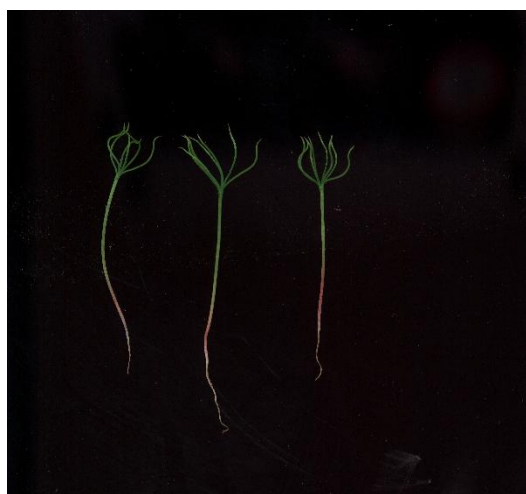
4.1 Zmiany morfologiczne siewek pod wpływem odwodnienia

W dniach 0, 1, 3, 5, 7 oraz 8 od zastosowania warunków stresowych wykonywano fotografie badanych oraz kontrolnych siewek sosny aby ocenić, jak ograniczenie dostępu do wody wpływa na ich morfologię. Do wykonania zdjęć wykorzystano skaner UMAX AlphaVista II.

Już w trzecim dniu obserwowane były niewielkie zmiany nawodnienia tkanek, widoczne szczególnie w przypadku części nadziemnej. W dniach 5-7 odwodnienie postępowało, epikotyl stawał się wiotki i opadający, natomiast część korzeniowa była odwodniona do tego stopnia, że powodowało to niemałe trudności z oczyszczeniem takiej siewki z resztek podłoża bez jej uszkodzenia. W dniu 8 po ponownym podlaniu siewek zaobserwowano prawie całkowity powrót części nadziemnej do stanu sprzed zastosowania stresu. Część podziemna nie była zdolna do tak szybkiej regeneracji – korzenie były wyraźnie cieńsze, ciemniejsze i bardziej wiotkie w porównaniu z korzeniami siewek kontrolnych.



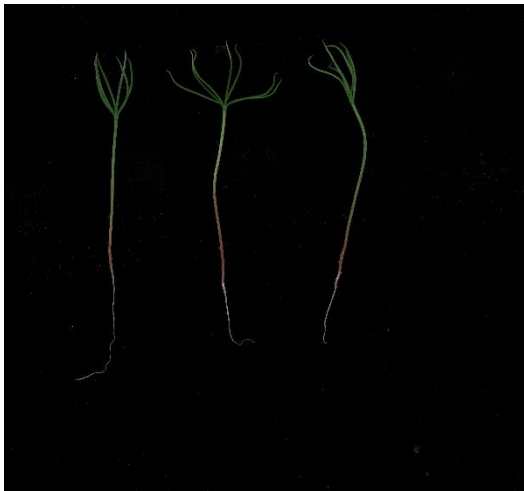
Dzień 0 – kontrola / stres



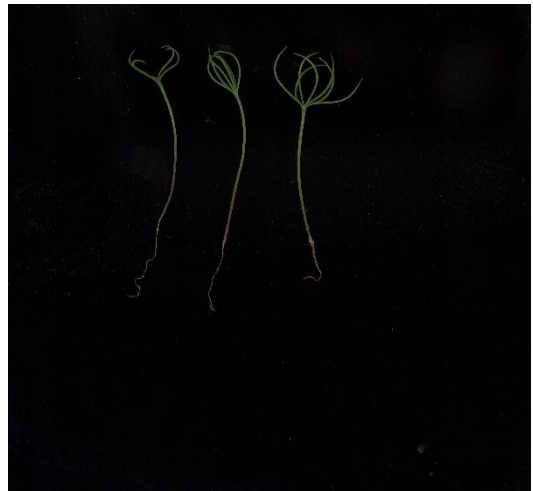
Dzień 1 – kontrola



Dzień 1 - stres



Dzień 3 – kontrola



Dzień 3 - stres



Dzień 5 – kontrola



Dzień 5 - stres



Dzień 7 – kontrola



Dzień 7 – stres



Dzień 8 – kontrola

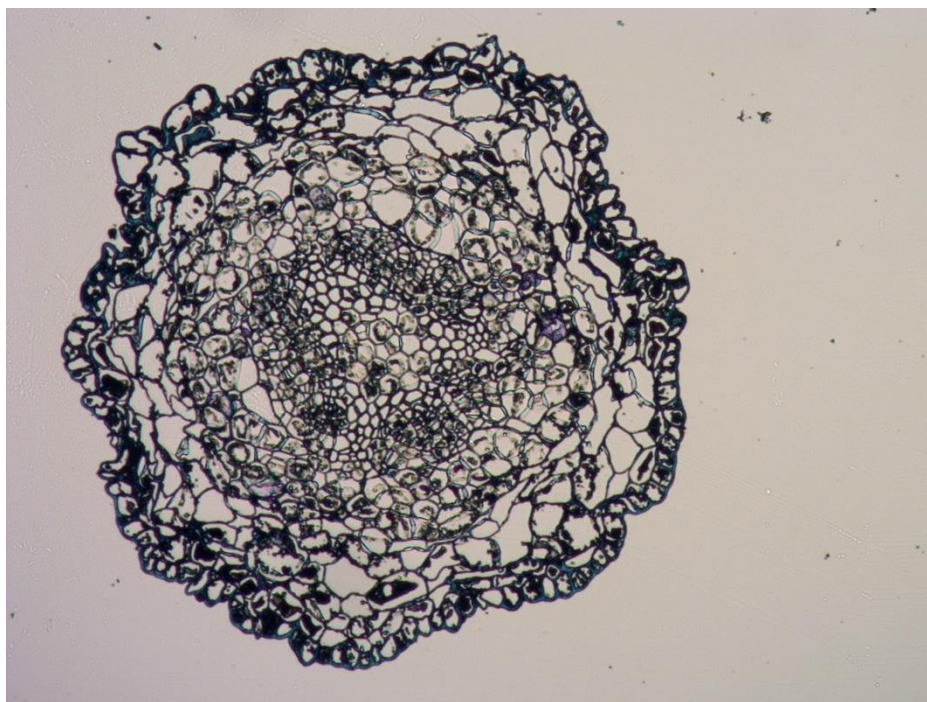


Dzień 8 – stres

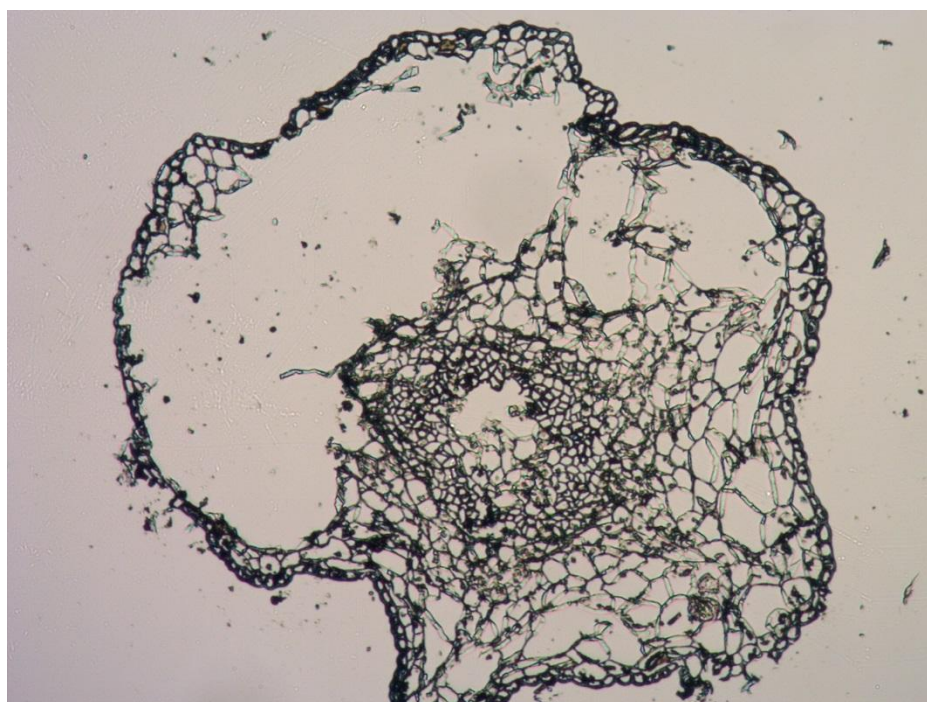
Ryc. 12 – 22. Fotografie obrazujące zmiany w budowie morfologicznej siewek sosny pod wpływem stresu odwodnienia (dzień 0-8)

4.2 Obserwacje mikroskopowe – celuloza i lignina

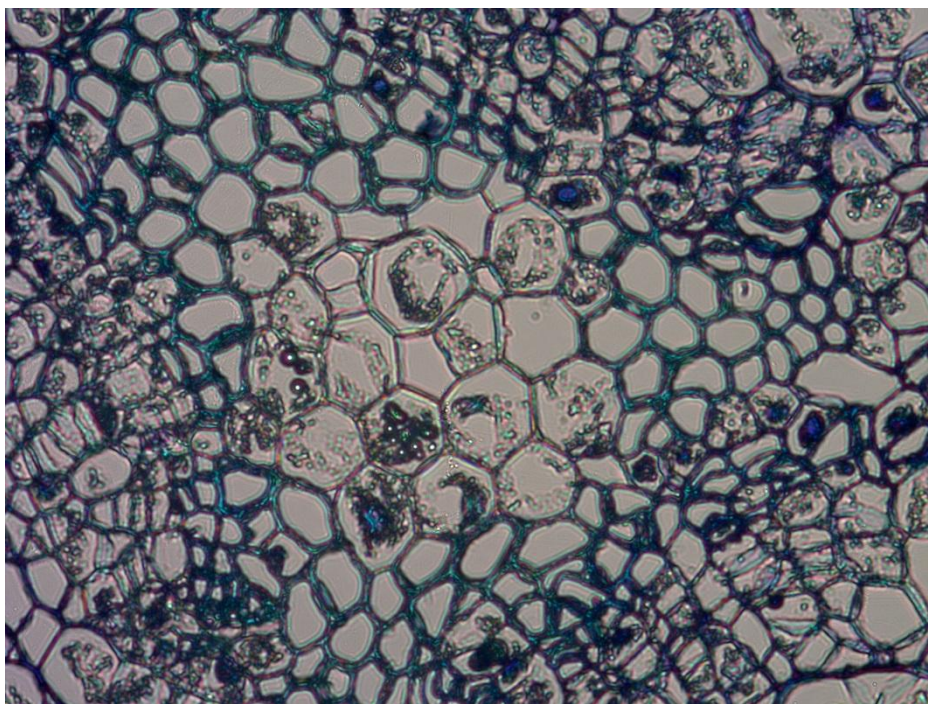
W celu oceny zmian w strukturze ścian komórkowych epikotylów i hipokotylów 30-dniowych siewek *Pinus sylvestris* przeprowadzono obserwacje mikroskopowe preparatów barwionych błękitem toluidynowym oraz floroglucyną. Barwienia te umożliwiły identyfikację struktur zawierających celulozę oraz ligninę i porównanie ich rozmieszczenia w roślinach kontrolnych oraz poddanych 7-dniowemu stresowi suszy.



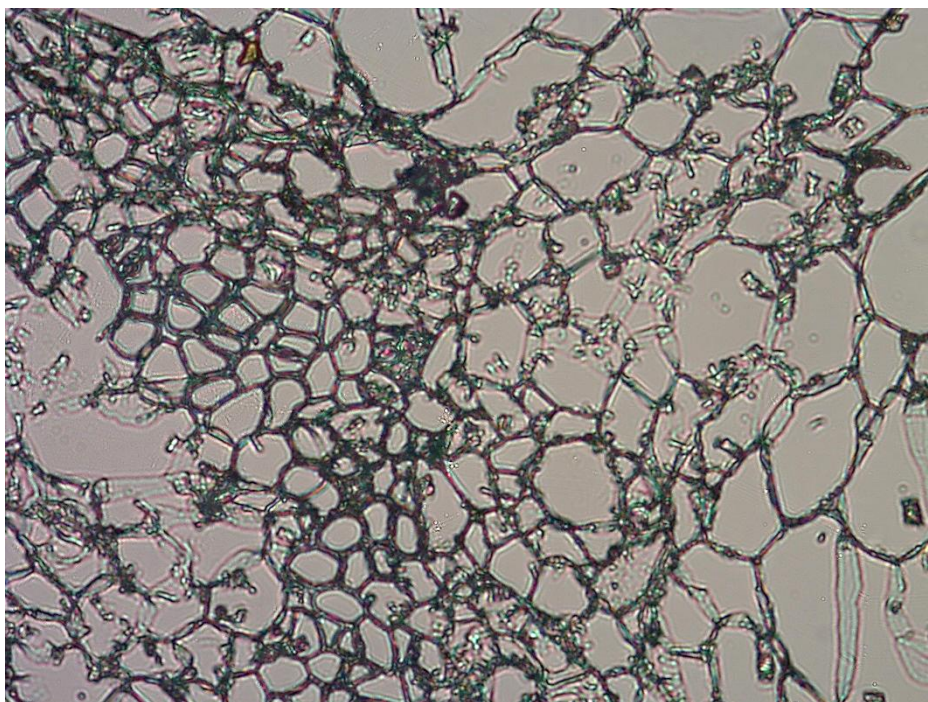
Ryc. 23. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 5x).



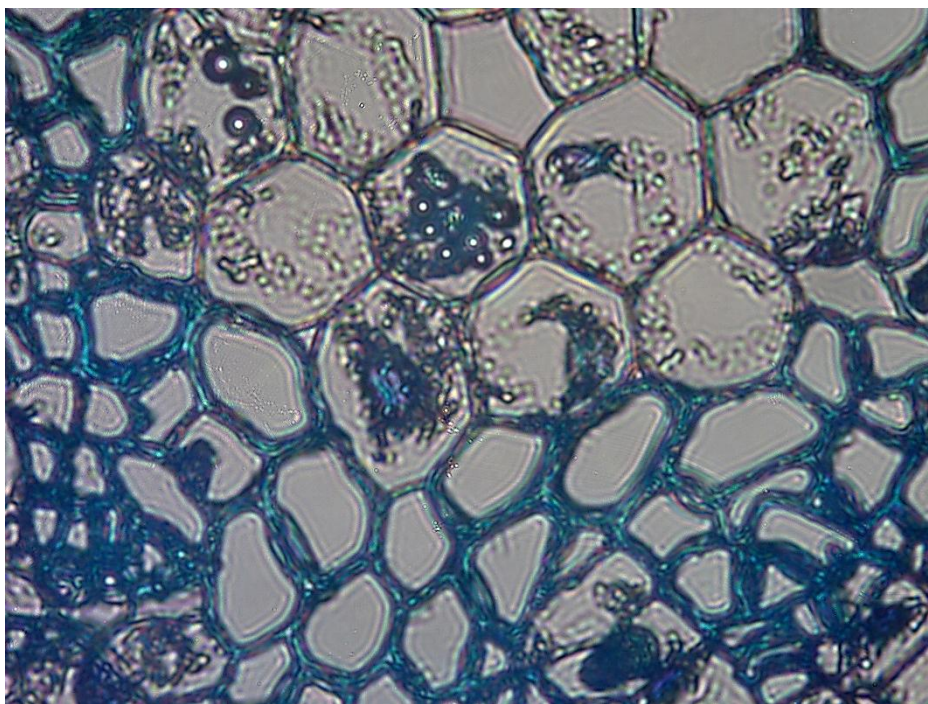
Ryc.24. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 5x).



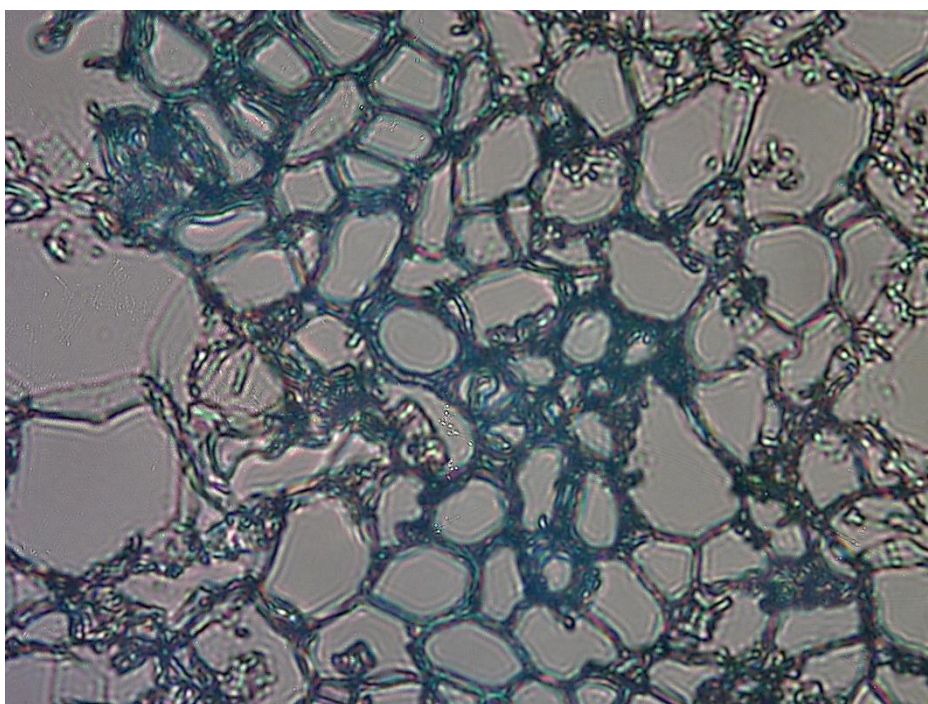
Ryc. 25. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 20x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.



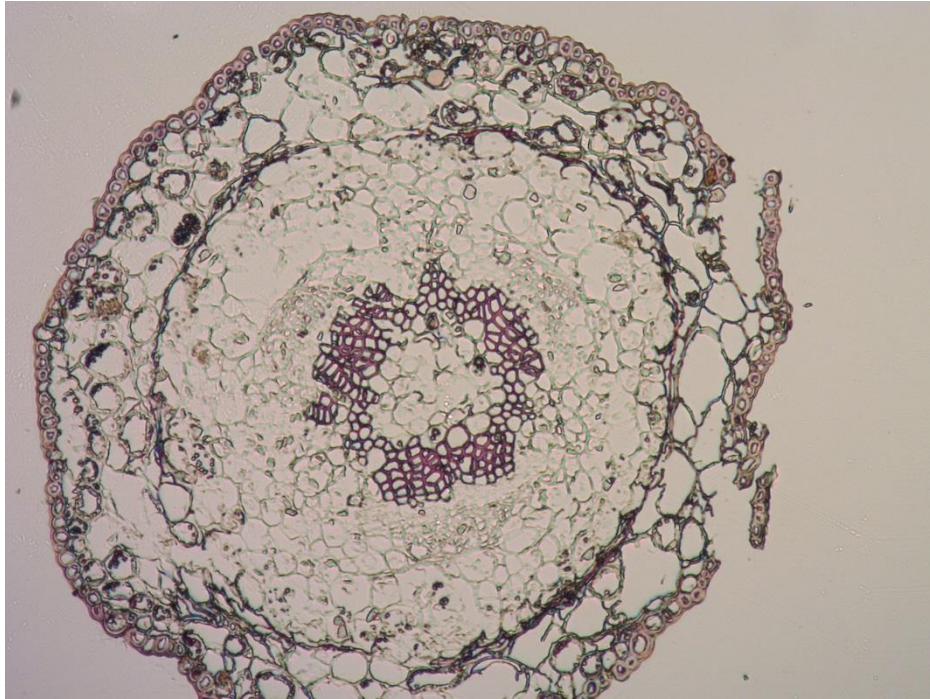
Ryc. 26. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 20x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.



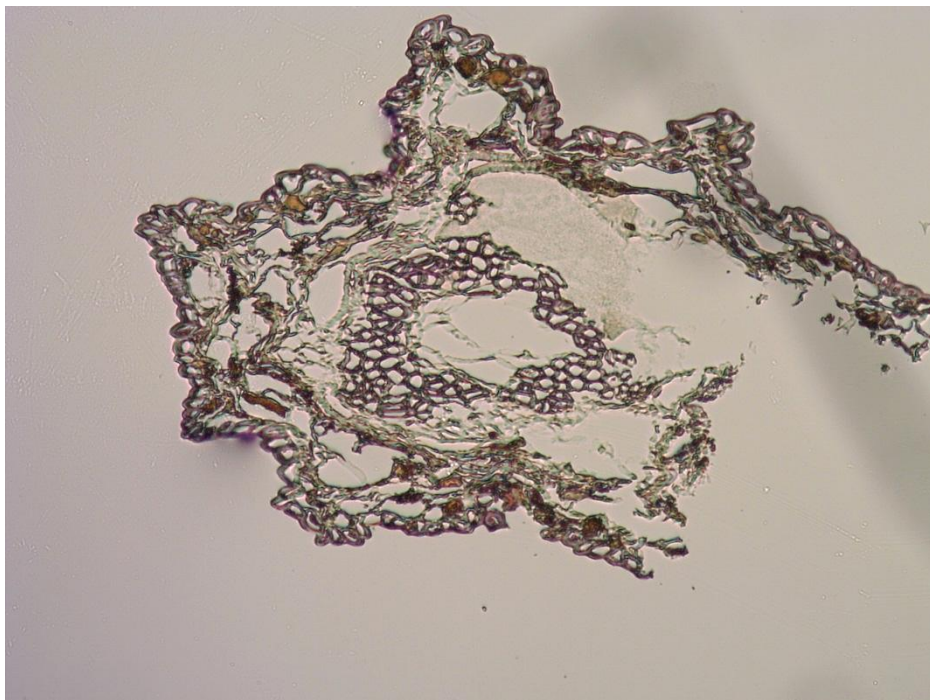
Ryc. 27. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 40x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.



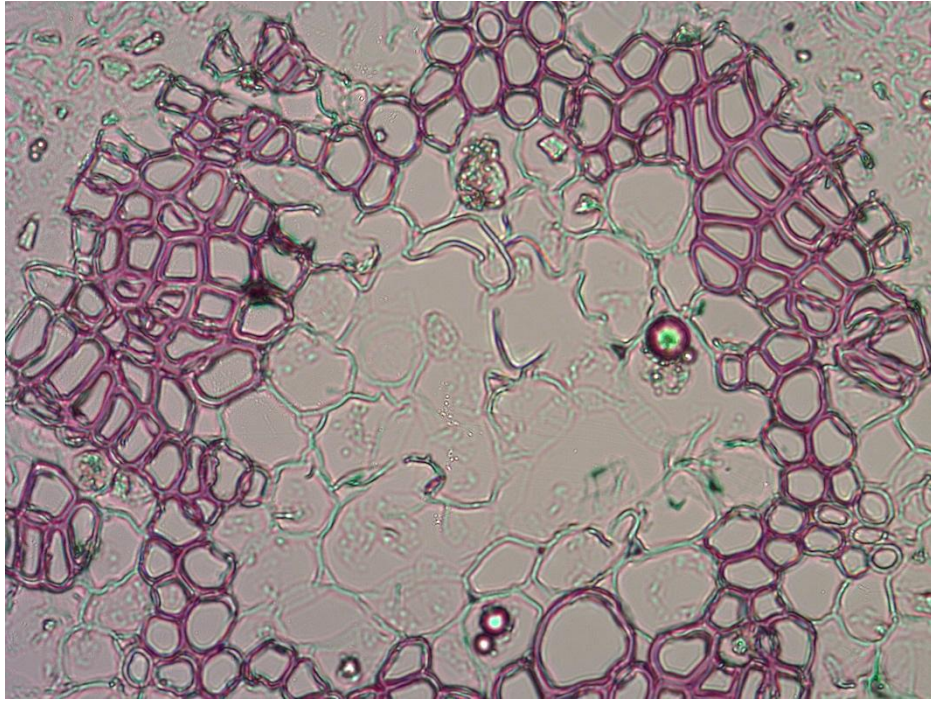
Ryc. 28. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 40x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.



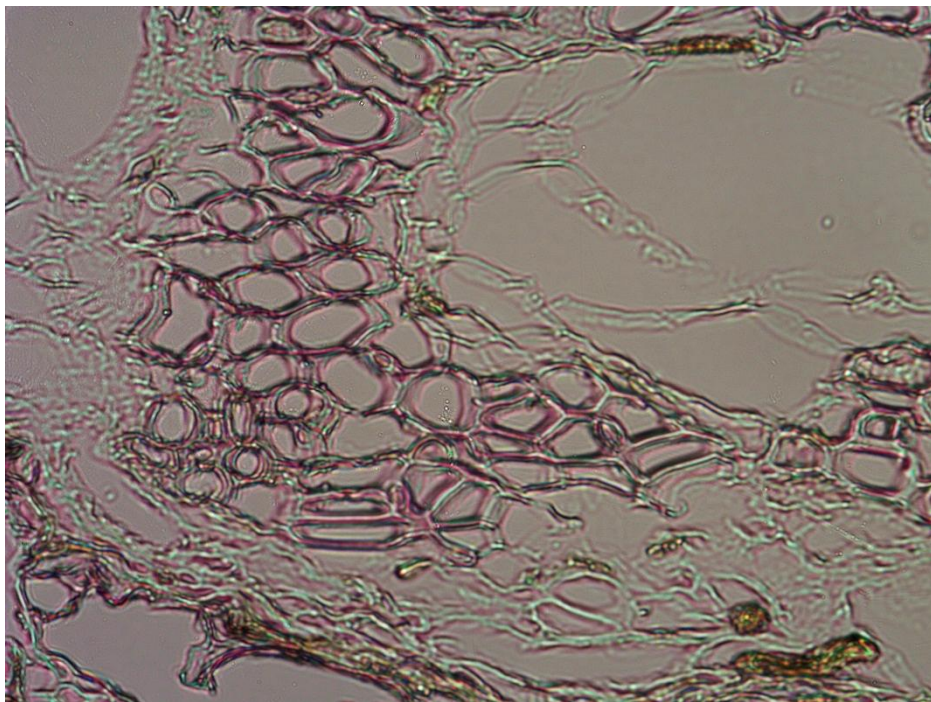
Ryc. 29. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 5x). Preparat barwiony floroglucyną.



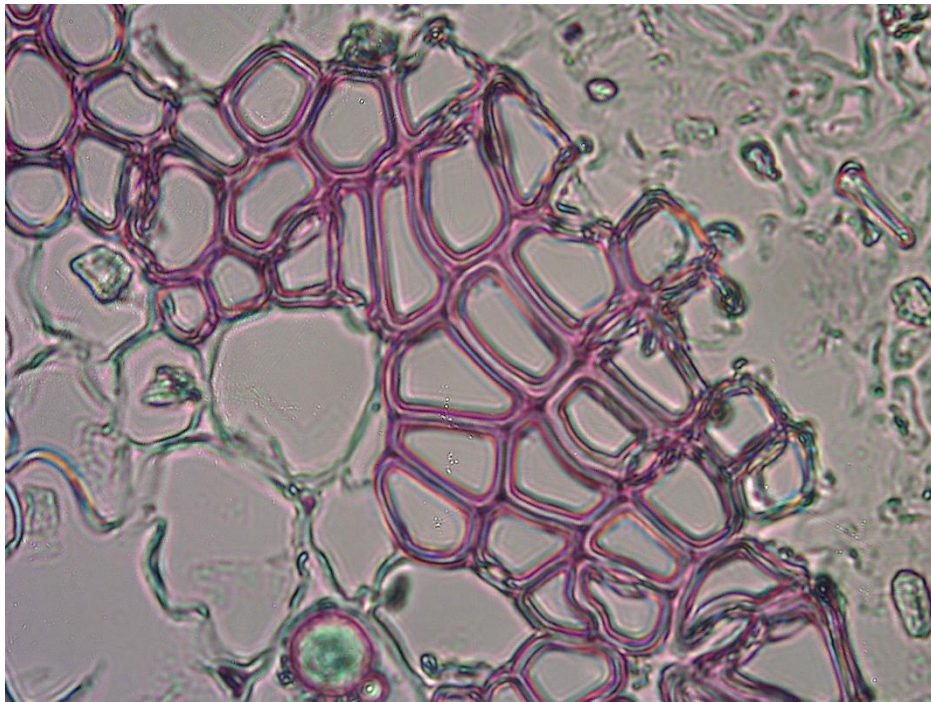
Ryc. 30. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 5x). Preparat barwiony floroglucyną.



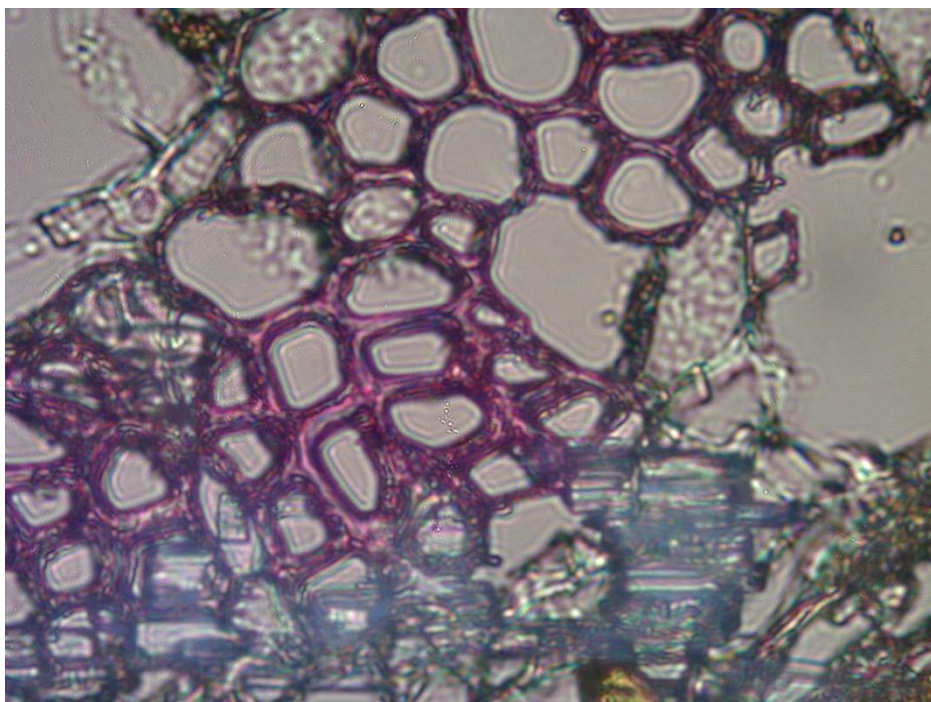
Ryc. 31. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 20x). Preparat barwiony floroglucyną.



Ryc. 32. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 20x). Preparat barwiony floroglucyną.



Ryc. 33. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 40x). Preparat barwiony floroglucyną.



Ryc. 34. Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 40x). Preparat barwiony floroglucyną.

Obserwacje mikroskopowe wykazały wyraźne nieregularności w rozmiarach i kształcie rozwijających się komórek ksylemu u siewek poddanych 7-dniowemu stresowi suszy w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Barwienie błękitem toluidynowym ujawniło struktury ścian komórkowych zarówno w próbie kontrolnej, jak i w siewkach poddanych stresowi suszy. Nie zaobserwowano wyraźnych różnic w intensywności zabarwienia ksylemu między wariantami, co może wskazywać na brak istotnych zmian w odkładaniu składników ściany komórkowej na tym etapie stresu.

W komórkach miękiszowych siewek poddanych suszy widoczne były objawy odwodnienia, takie jak zapadnięcie ścian komórkowych oraz zmniejszenie turgoru.

W preparatach barwionych floroglucyną obserwowano reakcję charakterystyczną dla ligniny w ścianach komórkowych ksylemu. Przy większym powiększeniu widoczne było pogrubienie ścian komórkowych w próbach poddanych stresowi, co może wskazywać na zwiększoną intensywność reakcji floroglucynowej.

4.3 Względna zawartość wody (RWC [%])

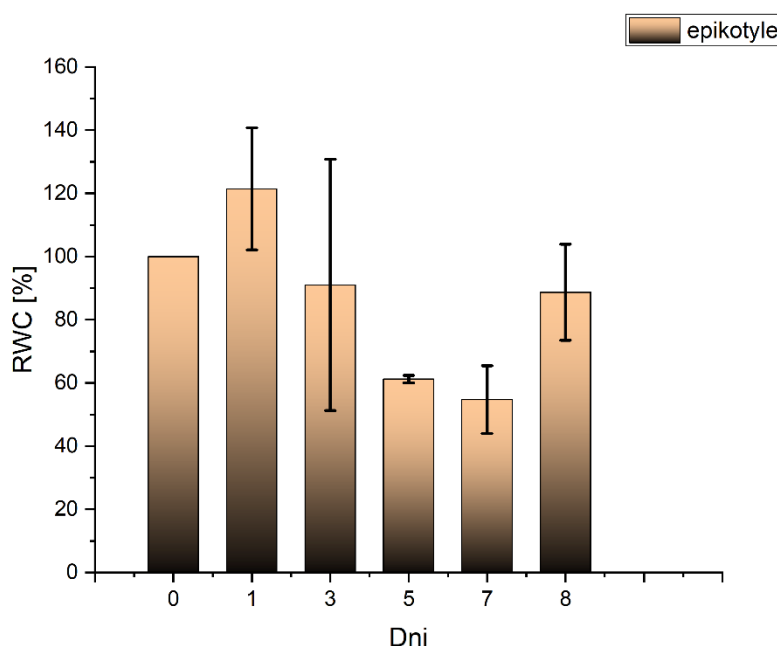
Aby określić poziom stosowanych warunków stresowych oznaczono względną zawartość wody w siewkach podczas stosowania stresu suszy. Obliczona procentowa zawartość wody w badanych siewkach spadała wraz z upływem czasu pod wpływem postępującego odwodnienia.

W przypadku epikotyli zanotowano najwyższą wartość RWC w pierwszym dniu w odniesieniu do kontroli (121,39%). Następnie w dniu 3 wartość spadła do 91,00%, a w dniu 5 wynosiła już 61,21%. Najniższy poziom nawodnienia był obserwowany zgodnie z przewidywaniami w dniu 7 (54,73%) i po nawodnieniu w dniu kolejnym powrócił niemal do wartości sprzed zastosowania stresu (88,71%).

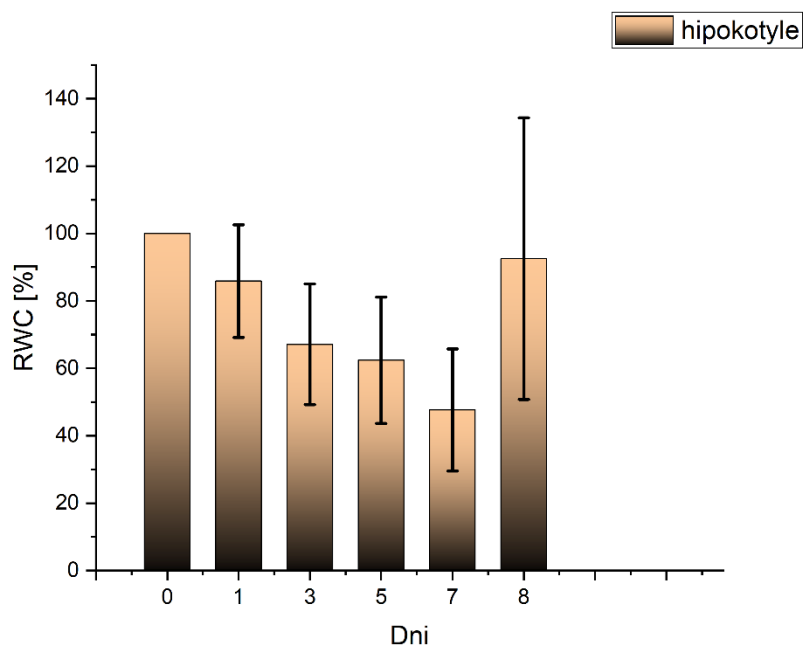
Hipokotyle oraz korzenie analizowano oddzielnie. Hipokotyle charakteryzowały się podobnym poziomem odwodnienia w większości punktów kontrolnych eksperymentu. Pierwszego dnia zanotowano jedynie niewielki spadek zawartości wody w stosunku do kontroli w porównaniu z częścią nadziemną (85,92%), co może świadczyć o tym, że pobrana woda

dłużej utrzymuje się w elementach przewodzących w obrębie zielonej części siewki, niż w części niżej położonej. W dniu 3, 5 i 7 (odpowiednio 67,11%, 62,38% i 47,66%) widać było postępujące odwodnienie hipokotyli. Po podlaniu obserwowano również wyraźny powrót tej części siewki praktycznie do poziomu nawodnienia zmierzonego dla siewek kontrolnych (dzień 8 - 92,57%).

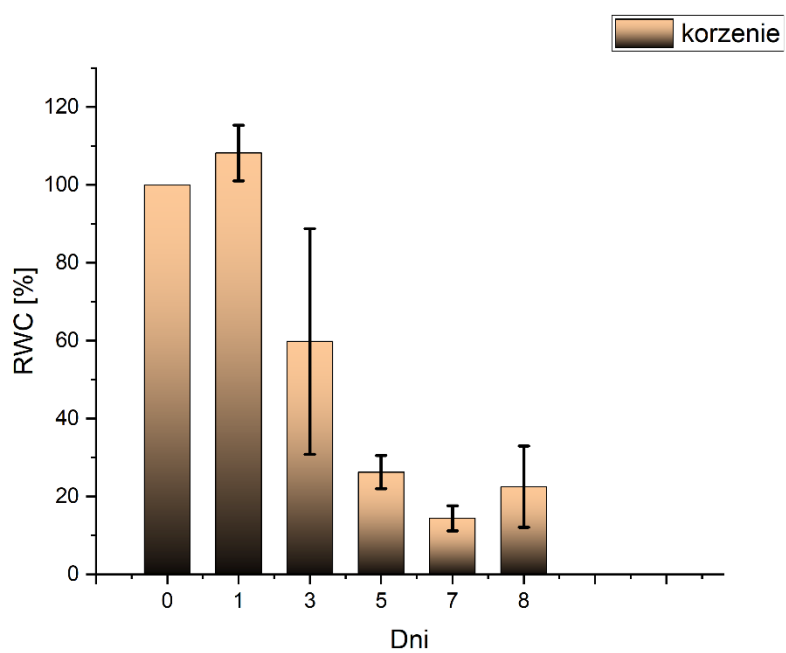
Korzenie znajdujące się w podłożu torfowym i mające znacznie ograniczony kontakt z powietrzem odznaczały się najsilniejszym deficytem wody podczas trwania eksperymentu. W dniu 1 zaobserwowano również niewielki wzrost wartości RWC (108,20%), natomiast w dniach kolejnych 3, 5 i 7 odwodnienie postępowało bardzo szybko (odpowiednio 59,81%, 26,24% i 14,40%), co było również bardzo widoczne w wyglądzie zewnętrznym korzeni. Po podlaniu podziemna część siewki nie wracała już do stanu fizjologicznego, a zmierzony poziom nawodnienia nie przekroczył 22,51%.



Ryc. 35. Poziom RWC [%] w epikotylach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu.



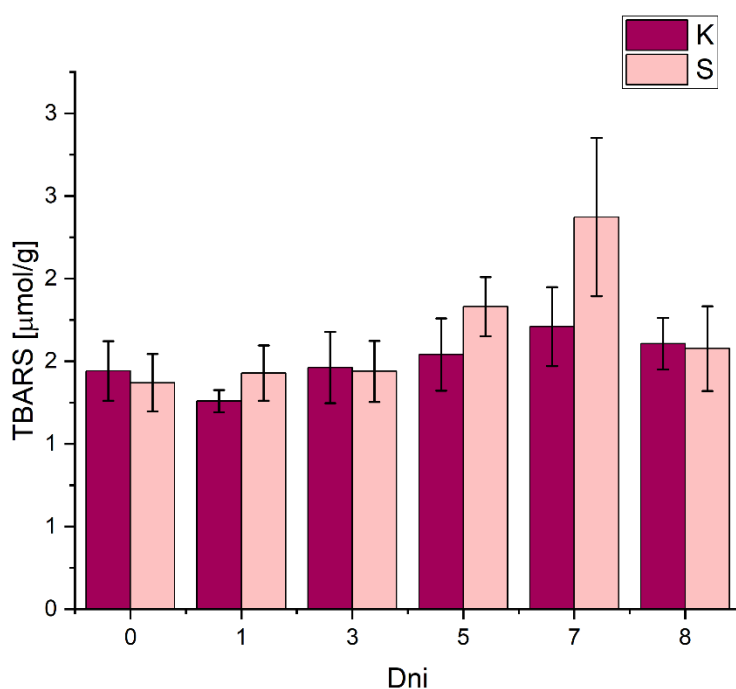
Ryc. 36 Poziom RWC [%] w hipokotylach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu.



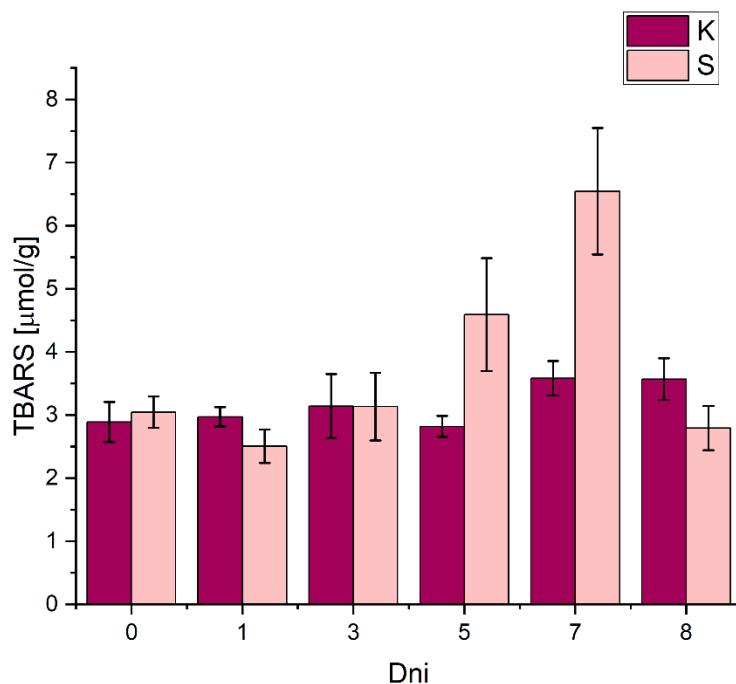
Ryc. 37. Poziom RWC [%] w korzeniach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu.

4.4 Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) – marker peroksydacji lipidów

W badaniach wykonywanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaobserwowano, że poziom odwodnienia siewek sosny na początkowym etapie ich rozwoju może wpływać na poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). W siewkach badanych zarówno w przypadku epikotyli jak hipokotyli i korzeni (dla których wykonywano pomiary łącznie ze względu na trudności z uzyskaniem zakładanej masy próbki składającej się jedynie z korzeni) obserwowano trend wzrostu poziomu TBARS od dnia 1 do dnia 7, a po podlaniu w dniu 8 jego spadek do poziomu zbliżonego do wartości dla siewek kontrolnych. Eksperyment składał się z 4 powtórzeń biologicznych i pomimo wyraźnego trendu wzrostu poziomu TBARS w warunkach stresu, różnice te nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej (test Manna–Whitneya, $p > 0,05$), prawdopodobnie ze względu na dużą zmienność biologiczną i ograniczoną liczbę powtórzeń



Ryc. 38. Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 4$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą i stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$).



Ryc. 39. Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) mierzony łącznie w hipokotylach i korzeniach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 4$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą i stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$).

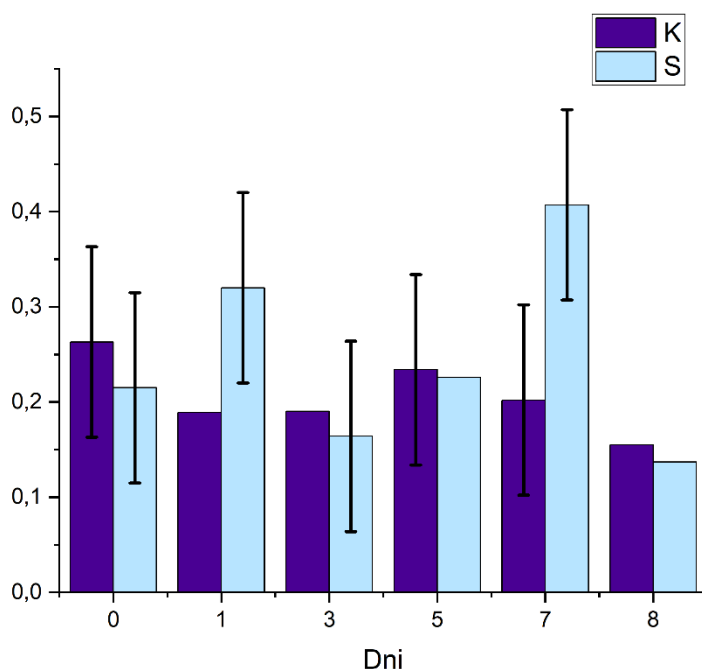
4.5 Poziom anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ w reakcji z NBT

Poziom anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oceniano pośrednio na podstawie zdolności redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT), a uzyskane wartości absorbancji traktowano jako względny wskaźnik jego obecności w badanym materiale. W przypadku epikotyli poziom badanego związku był niższy niż obserwowany w dolnych częściach. W dniu 7 w epikotylach siewek poddanych stresowi suszy wystąpił wzrost stężenia $O_2^{\bullet-}$, przy czym wartości charakteryzowały się dużym rozproszeniem, co przełożyło się na wysokie odchylenie standardowe. Tak duża zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi ($n = 6$) może wskazywać na zróżnicowaną odpowiedź roślin na zastosowane warunki eksperymentalne. W dniu 8, po nawodnieniu, poziom $O_2^{\bullet-}$ ulegał obniżeniu do wartości zbliżonych lub nieco niższych od wartości początkowych (dzień 0).

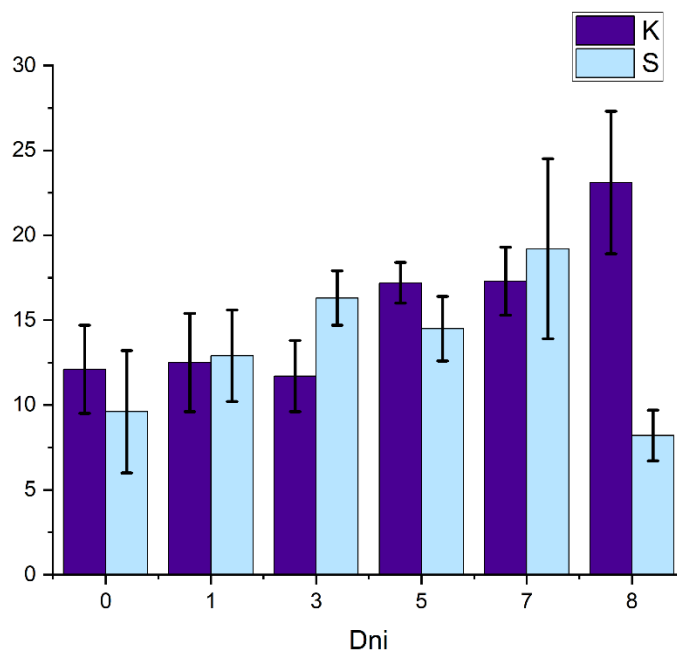
W siewkach kontrolnych poziom $O_2^{\bullet-}$ pozostawał względnie stabilny w czasie trwania doświadczenia i nie wykazywał istotnych zmian. We wszystkich analizowanych dniach w przypadku epikotyli różnice pomiędzy próbami kontrolnymi a poddanymi stresowi nie

osiągnęły poziomu istotności statystycznej (test U Manna–Whitneya, $p > 0,05$), co wskazuje na brak podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej.

Pomiary poziomu $O_2^{\bullet-}$ w materiale pozyskanym z hipokotyli i korzeni wykazały umiarkowany trend wzrostowy zarówno w siewkach kontrolnych jak i poddanych działaniu stresu suszy. Podobnie jak w epikotylach, najwyższe wartości odnotowano w dniu 7, odpowiadającym największemu stopniowi odwodnienia tkanek. Po ponownym nawodnieniu (dzień 8) w przypadku tej frakcji stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy próbą kontrolną a poddaną stresowi (test Manna–Whitneya, $p = 0,030$). W siewkach poddanych stresowi obserwowano spadek poziomu $O_2^{\bullet-}$, podczas gdy w siewkach kontrolnych wartości pozostawały na zbliżonym poziomie lub wykazywały tendencję wzrostową.



Ryc. 40. Poziom anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – absorbanca w przeliczeniu na gram świeżej masy. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 6$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą i stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$).



Ryc. 41. Względny poziom anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oceniany pośrednio na podstawie redukcji NBT (absorbancja) mierzony łącznie w korzeniach i hipokotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – absorbancja w przeliczeniu na gram świeżej masy. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 6$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą i stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya. Istotną statystycznie różnicę stwierdzono w dniu 8 ($p = 0,030$).

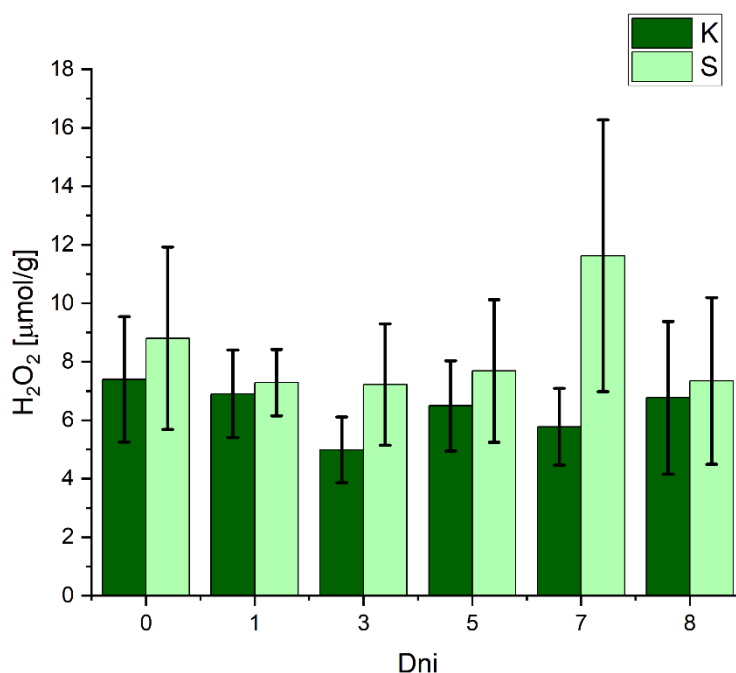
4.6 Poziom nadtlenu wodoru H_2O_2

W przypadku analizy dolnych części siewek (hipokotyle i korzenie) materiał był analizowany łącznie ze względu na trudności w uzyskaniu wystarczającej masy pojedynczej tkanki do przeprowadzenia oznaczeń biochemicznych. Należy jednak uwzględnić, że hipokotyl i korzeń różnią się fizjologią oraz odpowiedzią na stres, dlatego uzyskane wyniki należy interpretować jako odnoszące się do połączonej frakcji tkanek, a nie do poszczególnych organów oddzielnie.

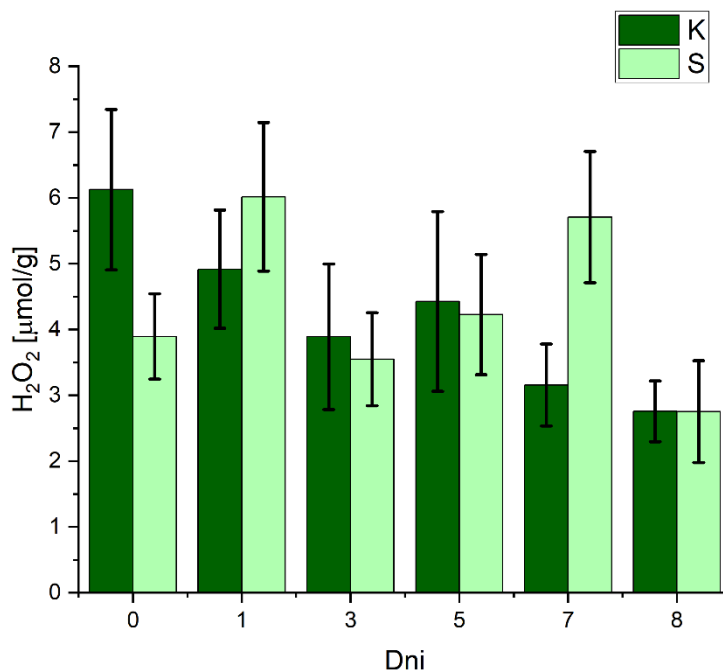
W trakcie trwania eksperymentu poziom nadtlenu wodoru (H_2O_2) w epikotylach utrzymywał się na zbliżonym poziomie do dnia 7, w którym obserwowano jego wzrost, a następnie spadek po nawodnieniu do wartości zbliżonych do wcześniejszych.

W analizowanej frakcji dolnych części siewek (obejmującej łącznie hipokotyle i korzenie) zaobserwowano podwyższony poziom H_2O_2 już w pierwszym dniu od zastosowania stresu. Ze względu na to, że wyniki stanowią średnią z 7 powtórzeń biologicznych, obserwacja ta może wskazywać na wczesną odpowiedź roślin na warunki stresowe, choć nie można wykluczyć wpływu zmienności biologicznej. Podobnie jak w epikotylach, najwyższe wartości odnotowano w dniu 7, odpowiadającym największemu nasileniu stresu, po czym następował spadek poziomu H_2O_2 , w niektórych przypadkach do wartości niższych niż początkowe.

W przypadku poziomu nadtlenu wodoru (H_2O_2) obserwowano dużą zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, co znalazło odzwierciedlenie w wysokich wartościach odchylenia standardowego. Pomimo widocznych trendów nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy siewkami kontrolnymi i traktowanymi stresem w żadnym z analizowanych dni (test Manna–Whitneya, $p > 0,05$). Zmienność ta może wynikać zarówno z naturalnych różnic fizjologicznych pomiędzy osobnikami, jak i z czułości zastosowanej metody detekcji.



Ryc. 42. Poziom nadtlenu wodoru (H_2O_2) w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – zawartość H_2O_2 [$\mu M/g$ świeżej masy]. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 7$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą a stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya ($p > 0,05$).



Ryc. 43. Poziom nadtlenu wodoru (H_2O_2) w dolnych częściach siewek sosny (obejmujących łącznie korzenie i hipokotyle) traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – zawartość H_2O_2 [$\mu M/g$ świeżej masy]. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD ($n = 7$). Istotność różnic pomiędzy kontrolą a stresem w poszczególnych dniach oceniano testem Manna–Whitneya ($p > 0,05$).

4.7 Badanie ekspresji genów metodą Real-Time RT-PCR

Ze względu na bardzo silne odwodnienie korzeni podczas prowadzenia eksperymentu i trudności z uzyskaniem wymaganej ilości materiału w badaniu ekspresji genów skupiono się na epikotylach.

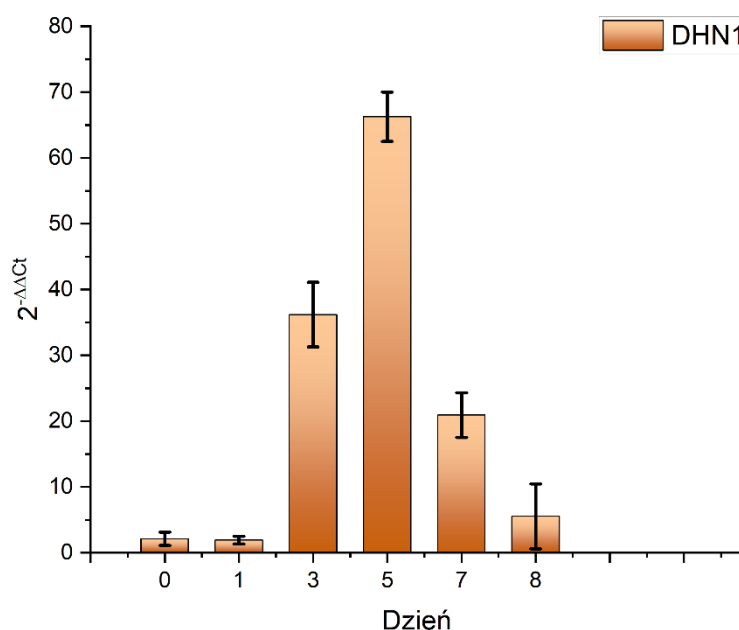
W analizie względnej ekspresji genu ***DHNI*** odnotowano wyraźne zmiany w czasie trwania doświadczenia (ryc. 44). W pierwszych dniach poziom ekspresji utrzymywał się na bardzo niskim poziomie (wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ bliskie 1), natomiast począwszy od 3. dnia zaobserwowano wzrost. Maksimum ekspresji wystąpiło w 5. dniu doświadczenia, gdzie ekspresja wzrosła ok. 70-krotnie. W kolejnych dniach (7. i 8.) poziom transkryptu uległ znacznemu obniżeniu.

Dla genu ***COMT*** zmiany ekspresji były bardziej umiarkowane (ryc. 45). Wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wzrastały sukcesywnie do 3. dnia, po czym następował ich spadek. Maksymalna wartość $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wynosiła około 20 w dniu 3.

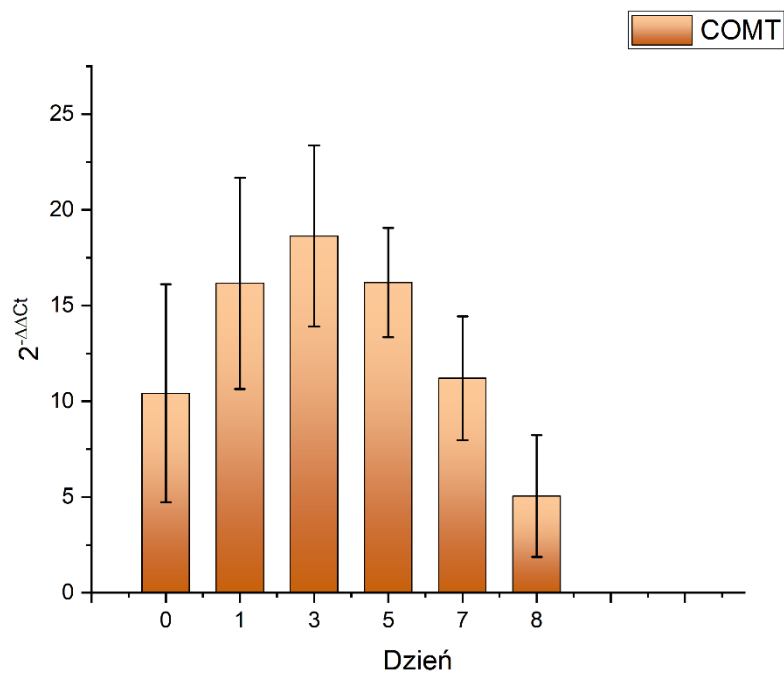
W przypadku genu *PIN1* ekspresja wykazywała odmienny wzorzec zmian (ryc. 46). Najwyższe wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ zarejestrowano we wczesnej fazie eksperymentu (dzień 1). Następnie ekspresja genu stopniowo malała, osiągając najniższe wartości w 5. i 7. dniu doświadczenia, by ponownie wzrosnąć po nawodnieniu siewek.

Ekspresja genu *HDZ33* stopniowo wzrastała w czasie trwania doświadczenia (ryc. 47). Początkowo wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ były niskie, natomiast w kolejnych dniach obserwowano ich wzrost, osiągając maksymalne wartości w 8. dniu.

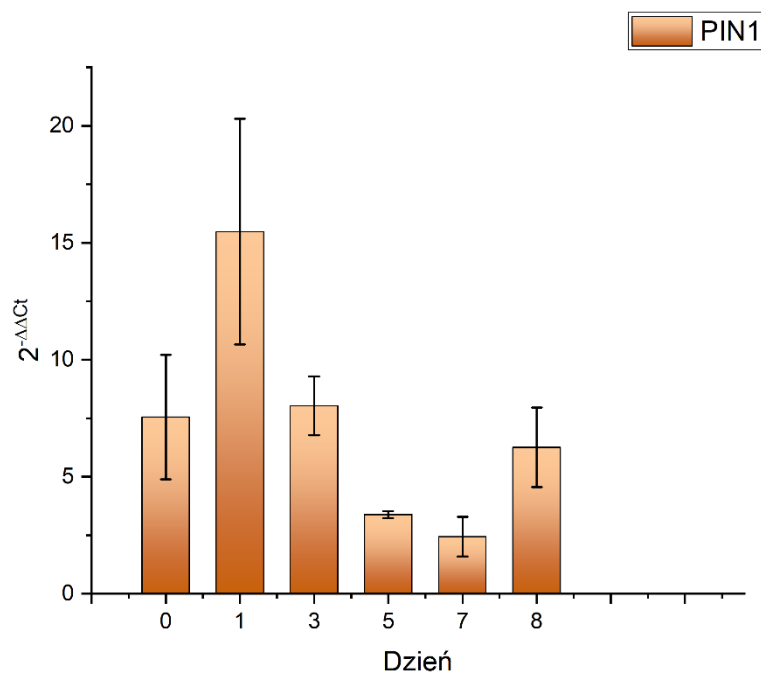
We wszystkich analizowanych przypadkach wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$). Mimo tak wyraźnego efektu biologicznego, zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi była zbyt duża, aby różnice osiągnęły poziom istotności statystycznej (test Manna–Whitneya, $p > 0,05$). Prawdopodobną przyczyną jest niewielka liczba powtórzeń doświadczenia. Wyniki pokazują jedynie tendencje, które przy zastosowaniu większej liczby powtórzeń mogłyby się uwidocznic.



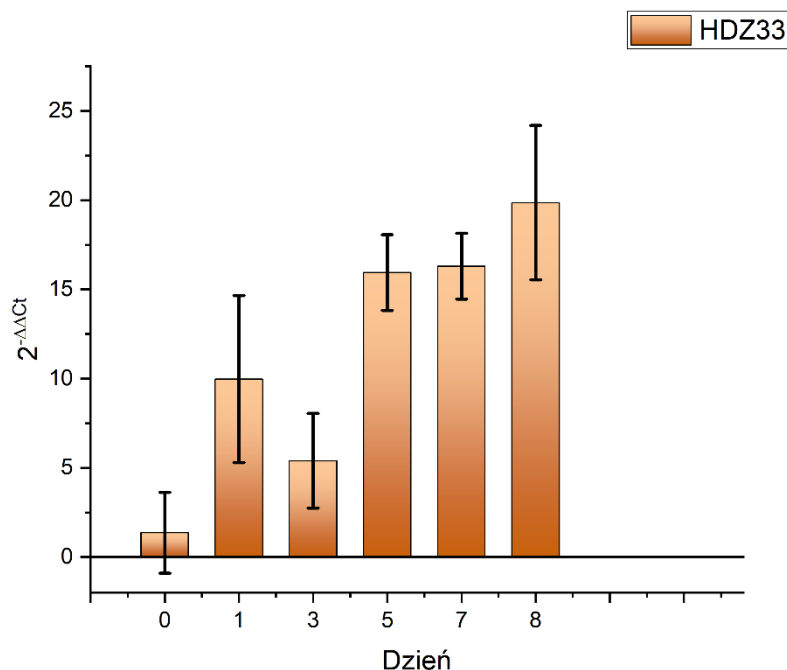
Ryc. 44. Względna zmiana ekspresji genu *DHN1* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).



Ryc. 45. Względna zmiana ekspresji genu *COMT* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).



Ryc. 46. Względna zmiana ekspresji genu *PIN1* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).



Ryc. 47. Względna zmiana ekspresji genu *HDZ33* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).

5. DYSKUSJA

Obserwacje mikroskopowe – synteza celulozy i lignifikacja

W odpowiedzi roślin na stres suszy zachodzą nie tylko zmiany fizjologiczne, ale również istotne przekształcenia strukturalne na poziomie komórkowym. Procesy takie jak biosynteza celulozy oraz lignifikacja ścian komórkowych odgrywają kluczową rolę w adaptacji tkanek przewodzących do warunków ograniczonej dostępności wody, wpływając na stabilność komórek, ich właściwości mechaniczne oraz odporność na kawitację. Zmiany te można zaobserwować dzięki analizie mikroskopowej, która dostarcza bezpośrednich informacji o dynamice przekształceń w budowie i składzie ścian komórkowych ksylemu.

W celu uchwycenia mikrostrukturalnych zmian zachodzących w tkankach siewek sosny zwyczajnej w odpowiedzi na proces odwodnienia, wykonano przekroje poprzeczne siewek na mikrotomie i przeprowadzono ich dokumentację mikroskopową. Analiza obrazów umożliwiła ocenę zmian w składzie ścian komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem stopnia

lignifikacji oraz zawartości celulozy, co może odzwierciedlać adaptacyjne przekształcenia strukturalne na poziomie komórkowym.

W odpowiedzi na stres suszy, biosynteza celulozy ulega zmianom zależnym od gatunku rośliny. W wielu przypadkach obserwuje się spadek zawartości celulozy, jak wykazano u *Arabidopsis*, komórek zawieszinowych tytoniu (*Nicotiana benthamiana*), liści winorośli (*Vitis vinifera*). Jednakże, w przypadku bawełny (*Gossypium hirsutum*), zaobserwowano wzrost biosyntezy celulozy w odpowiedzi na suszę, co wskazuje na istnienie różnych mechanizmów adaptacyjnych mających na celu utrzymanie integralności ściany komórkowej i ciśnienia turgorowego (Geng i in. 2018). W badaniu przeprowadzonym w ramach niniejszej rozprawy nie zaobserwowano istotnych różnic w odkładaniu celulozy między wariantem kontrolnym a suszonym po 7 dniach, co znajduje odzwierciedlenie w wynikach barwienia błękitem toluidynowym. Może to świadczyć o tym, że wczesna odpowiedź rośliny na suszę nie obejmuje jeszcze znaczących zmian w biosyntezie celulozy w ścianach komórek ksylemu.

Eksperymenty wykonane w niniejszej pracy koncentrowały się na ostrej, krótkoterminowej odpowiedzi młodych siewek. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały zwiększoną lignifikację rozwijających się tkanek przewodzących w odpowiedzi na stres suszy, co może wskazywać na rosnącą rolę ligniny w adaptacji ksylemu do warunków ograniczonej dostępności wody. Podobne zmiany obserwowano u hybrydowych topoli (*Populus tremula* × *tremuloides*), gdzie w warunkach silnego stresu suszy formowało się drewno o mniejszych światłach naczyń, wyraźnie grubszych ścianach włókien oraz zwiększonym udziale powierzchni ścian komórkowych w przekroju poprzecznym drewna. Co istotne, mimo fizjologicznego pogrubienia ścian komórkowych, klasyczna kaskada transkrypcyjna odpowiedzialna za biosyntezę składników ściany wtórnej (w tym ligniny) była w topoli hamowana, a zamiast tego aktywowane zostały liczne geny zaangażowane w przebudowę ściany komórkowej. Może to sugerować, że także w przypadku badanych siewek sosny zwyczajnej zwiększona lignifikacja tkanek ksylemu jest częścią alternatywnego programu odpowiedzi stresowej, który różni się od typowego mechanizmu rozwojowego i pozwala na wzmocnienie elementów przewodzących w warunkach deficytu wody.

Zwiększona zawartość ligniny obserwowana w niniejszym badaniu u siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) poddanych stresowi suszy może wskazywać na aktywację szlaku lignifikacji jako jednej z form adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych. Wyniki te są zgodne z doniesieniami literaturowymi sugerującymi, że lignifikacja odgrywa istotną rolę w zwiększaniu tolerancji roślin na stresy abiotyczne, w tym suszę, poprzez wzmocnianie ścian komórkowych i ograniczanie przewodnictwa wodnego w ksylemie. U

różnych gatunków geny związane z biosyntezą ligniny mogą wykazywać zróżnicowaną ekspresję pod wpływem stresu.

Jak wykazano m.in. u *Arabidopsis* i u topoli, zwiększone stężenie ABA – będące klasyczną odpowiedzią roślin na stres wodny – może aktywować czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC (np. SND1) i MYB (np. MYB46), które regulują ekspresję genów biosyntezy ligniny, takich jak *CCR2*, *C4H2*, *COMT2* czy *CCoAOMT1*. Co istotne, niektóre transkrypcyjne "przełączniki główne" (np. SND1, NST1, MYB83) biorą jednocześnie udział w odpowiedzi na stres osmotyczny i wodny, co sugeruje istnienie wspólnej osi sygnalizacyjnej dla lignifikacji i adaptacji do stresów środowiskowych. W różnych gatunkach, takich jak brzoza, jabłoń czy ryż, nadekspresja tych czynników prowadziła do zwiększenia odkładania ligniny i poprawy tolerancji na suszę (Han i in. 2022). Opierając się na tych danych, można przypuszczać, że również w przypadku sosny zwyczajnej stres wodny prowadzi do aktywacji konserwatywnego mechanizmu transkrypcyjnego regulującego lignifikację, który pełni funkcję ochronną i adaptacyjną w warunkach ograniczonej dostępności wody.

Warto zaznaczyć, że długoterminowe oddziaływanie deficytu wody może prowadzić do znacznie szerszych zmian morfologicznych i fizjologicznych niż te obserwowane w krótkoterminowej odpowiedzi stresowej. Zagadnienie wpływu deficytu wody na wzrost i rozwój sosny zwyczajnej było wcześniej podejmowane m.in. przez Pearson i in. (2013), którzy badali reakcję dwuletnich siewek tego gatunku na długoterminowy stres suszy oraz zalewania na podłożu z nieprzetworzonego torfu. Ich wyniki wykazały, że susza wyraźnie ograniczała wzrost pędów i korzeni, a także wpływała na parametry fizjologiczne, takie jak efektywność fotosyntetyczna, metabolizm poliamin oraz przewodnictwo hydrauliczne.

Markery stresu oksydacyjnego

W celu oceny nasilenia reakcji stresowej w badanych siewkach sosny zwyczajnej oznaczono poziom wybranych markerów stresu oksydacyjnego – produktów peroksydacji lipidów (MDA), anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2). Parametry te należą do grupy fizjologiczno-biochemicznych wskaźników powszechnie

stosowanych do oceny odpowiedzi roślin na deficyt wody, ze względu na ich rolę w obrazowaniu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych oraz aktywacji mechanizmów obronnych. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźne tendencje zmian w poziomie reaktywnych form tlenu i pochodnych uszkodzeń lipidów, co sugeruje uruchomienie odpowiedzi stresowej w wyniku odwodnienia.

Peroksydacja lipidów może wystąpić w reakcji na różne rodzaje czynników stresowych i jest powiązana ze stresem oksydacyjnym. W badaniach nad sosną zwyczajną wykazano, że długotrwały stres środowiskowy, taki jak zanieczyszczenie powietrza i gleby, prowadzi do zmian w składzie lipidów błon komórkowych, w tym obniżenia poziomu fosfolipidów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz spadku zawartości α - tokoferolu – lipofilnego antyoksydantu. Obserwowane zmiany są zgodne z obrazem stresu oksydacyjnego (Pukacki i Kamińska-Rożek 2002). Podobne mechanizmy mogą być aktywowane również w odpowiedzi na suszę, co podkreśla znaczenie badań nad lipidowym profilem stresu środowiskowego. W badaniach przeprowadzonych na sosnach egzotycznych (*P. elliotii* i *P. taeda*) metodą spektroskopową wykazano, że zawartość MDA wzrastała w początkowej fazie stresu suszy, osiągając maksimum po 7–14 dniach, w zależności od nasilenia stresu (Zhang i in., 2021). W niniejszym badaniu również stwierdzono wzrost poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w tkankach siewek sosny zwyczajnej, który osiągał maksimum w dniu 7 eksperymentu – a więc w momencie największego nasilenia stresu wodnego. Zmiany poziomu MDA mogą odzwierciedlać rzeczywisty poziom uszkodzeń błon lipidowych oraz skuteczność mechanizmów adaptacyjnych roślin. Wyniki te potwierdzają przydatność oznaczania MDA jako markera stresu oksydacyjnego i narzędzia do oceny tolerancji na suszę również w przypadku drzew iglastych.

W czteroletnich siewkach świerka pospolitego (*Picea abies*), poddanych stresowi suszy o różnym nasileniu, zaobserwowano wyraźne objawy stresu oksydacyjnego, w tym wzrost poziomu reaktywnych form tlenu – anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) oraz nadttlenku wodoru (H_2O_2), których stężenia przekraczały poziom kontrolny odpowiednio o 116% i 30% (Kamińska-Rożek i Pukacki 2004). Zjawisku temu towarzyszyły typowe objawy uszkodzeń błon komórkowych: zwiększona przepuszczalność, degradacja fosfolipidów, oksydacja kwasów tłuszczowych oraz wzrost zawartości malonodialdehydu. Jednocześnie odnotowano wzmożoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD) oraz zużycie niskocząsteczkowych antyoksydantów (GSH, AsA, flawonoidy, α -tokoferol), co potwierdza intensywną odpowiedź obronną na poziomie komórkowym.

Podobne zmiany zaobserwowano w niniejszym eksperymencie z młodymi siewkami sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), u których również stwierdzono wzrost poziomu $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 w warunkach odwodnienia, równolegle z podwyższeniem wskaźników peroksydacji lipidów (TBARS). Zbieżność obserwowanych mechanizmów u różnych gatunków iglastych i na różnych etapach rozwoju sugeruje, że wzrost stężenia ROS jest często obserwowanym i istotnym elementem odpowiedzi drzew iglastych na stres suszy. Obserwacje te mogą odzwierciedlać nasilenie stresu oksydacyjnego w badanych tkankach. Należy jednak podkreślić, że w niniejszej pracy nie oznaczano bezpośrednio aktywności enzymów antyoksydacyjnych ani poziomu niskocząsteczkowych antyoksydantów, dlatego wnioski dotyczące aktywacji mechanizmów obronnych mają charakter pośredni.

Uzyskane wyniki sugerują również, że młode siewki sosny mogą wykazywać zwiększoną wrażliwość na zmiany dostępności wody. Należy jednak zaznaczyć, że wyniki te odnoszą się do wczesnych faz rozwojowych oraz warunków eksperymentalnych i stanowią przesłankę do dalszych badań, w szczególności terenowych, nad przeżywalnością i wzrostem odnowień w warunkach suszy.

Badania ekspresji genów

W ramach niniejszej rozprawy zbadano wybrane geny, których potencjalne funkcje w procesie ksylogenezy lub/i odpowiedzi na warunki stresowe były sygnalizowane w literaturze. Badania ekofizjologiczne gatunków drzewiastych z użyciem technik biologii molekularnej były prowadzone od wielu lat. Zmiany ekspresji genów u drzew iglastych badano głównie metodami analizy transkryptomowej oraz PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR, qRT PCR). Cele takich analiz są zwykle różnorodne i zależą od kontekstu badawczego. Tak szerokie podejście umożliwia zidentyfikowanie jak największej liczby transkryptów, które świadczą o aktywacji bądź supresji określonych sekwencji w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe. Badania interakcji między różnymi genami i selektywnej ekspresji u różnych odmian lub klonów są kluczowe dla zrozumienia działania sieci regulacyjnych w komórkach.

O sosnie zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) odnośnie genów w różny sposób powiązanych z odwodnieniem wiemy stosunkowo niewiele - inne gatunki sosny są pod tym względem dużo lepiej scharakteryzowane. Od ponad 20 lat prowadzone są badania zmian ekspresji genów pod

wpływem suszy u amerykańskiej sosny *Pinus taeda* (Li i in. 2021). Przy użyciu analizy transkryptomowej wykryto u tego gatunku istotne różnice w ekspresji genów związanych z deficytem wody w zależności od odporności poszczególnych klonów na ten rodzaj stresu.

Do dość dobrze poznanych pod tym względem gatunków zalicza się również sosna *Pinus massoniana* występująca w Chinach i na Tajwanie. Wśród genów, których ekspresja zmienia się u tej sosny pod wpływem stresu suszy opisano m.in. rodziny czynników transkrypcyjnych, takie jak *DREB* (*Dehydration Response Element Binding Factors*), *ERF* (*Ethylene Responsive Factor*), czy *ABRE* (*ABA Response Element*) (Du i in. 2018).

Inne czynniki transkrypcyjne o ekspresji wrażliwej na stres suszy u *Pinaceae* to białka z rodziny NAC (Han i in. 2023), WRKY, MYB (Sun i in. 2022, Zhang i in. 2023) i bZIP (Du i in. 2018). Czynniki transkrypcyjne *MYB* jest zaangażowany w aktywację transkrypcji genów związanych ze szlakiem fenylpropanoidowym, który jest połączony ze szlakiem biosyntezy ligniny, a więc z jednym z ostatnich etapów procesu ksylogenezy.

W niniejszym eksperymencie dobór genów do analizy oparto zarówno na ich potencjalnym znaczeniu biologicznym, związanym z procesami ksylogenezy oraz odpowiedzią roślin na stres środowiskowy, jak i z uwagi na ograniczoną dostępność sekwencji nukleotydowych w ogólnodostępnych bazach danych (NCBI).

Wnioski dotyczące ekspresji genów należy interpretować z ostrożnością ze względu na minimalną liczebność replik biologicznych oraz ograniczenia walidacji starterów.

Do charakterystycznych białek pojawiających się w warunkach suszy należą bez wątpienia dehydryny (DHNs), które są syntetyzowane w roślinach w odpowiedzi na abiotyczne warunki stresowe, takie jak niska lub wysoka temperatura, zbyt wysokie stężenie soli w glebie, ale przede wszystkim pojawiają się one w reakcji na odwodnienie (stąd ich nazwa). Dehydryny należą do grupy II białek LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Charakteryzują się obecnością konserwatywnych domen strukturalnych (motyw K, S i Y), które umożliwiają im stabilizację błon komórkowych oraz ochronę białek przed denaturacją w warunkach deficytu wody (Perdiguero i in. 2015). Białka te akumulowane są w chloroplastach i ścianach komórkowych, a ich poziom może wzrastać sezonowo wraz ze zmianami dostępności wody w ciągu roku (Kontunen-Soppela i Laine 2001, Korotaeva i in. 2015). Ekspresja genów należących do rodziny *DHN* zmienia się też w różnym stopniu u różnych gatunków sosny, przystosowanych do innych warunków środowiskowych. Perdiguero i in. (2015) wykazali istotny wzrost ekspresji genów dehydryn typu K2 (odpowiedników *Dhn1*) w igłach i łodygach jednorocznych

siewek *Pinus pinea* poddanych przedłużającej się suszy. Ekspresja genu *dhn_K2b* wzrosła nawet 100-krotnie w stosunku do kontroli, co potwierdza kluczową rolę tych białek w reakcji na odwodnienie.

Dehydrynę DHN1 wybrano jako pierwszy z badanych genów, aby porównać ewentualną ekspresję tego genu w warunkach stresu suszy oraz w warunkach kontrolnych. Zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji genu DHN1 w odpowiedzi na odwodnienie u miesięcznych siewek *Pinus sylvestris*, co potwierdzono w odrębnej analizie względem dwóch genów referencyjnych (*EF1* i aktyny). Wzrost ekspresji był zauważalny już we wczesnych etapach stresu wodnego, a względna ekspresja genu osiągała wartości nawet ponad 60-krotnie wyższe w stosunku do kontroli, co wskazuje na silną i szybką odpowiedź transkrypcyjną. Taki wynik sugeruje, że *DHN1* może odgrywać istotną rolę ochronną w najwcześniejszych fazach reakcji na odwodnienie, działając jako jeden z „pierwszych strażników” sygnalizujących warunki stresu abiotycznego. W literaturze dehydryny typu DHN1 były często opisywane jako białka konstytutywne, obecne w roślinach również bez ekspozycji na stres, z umiarkowaną indukcją po jego wystąpieniu. Kartashov i in. (2021) wykazali, że u 20-dniowych siewek sosny zwyczajnej akumulacja białka DHN1 była obserwowana zarówno w warunkach kontrolnych, jak i suszy, a ekspresja genu *PsDhn1* wzrastała jedynie ok. 5–6 razy. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy różnią się od tych obserwacji, co może wynikać z kilku czynników, w tym różnic w wieku roślin, rodzaju stresu (naturalne odwodnienie vs. sztuczne suszenie PEG), czy też warunkach prowadzenia eksperymentu. Tak silna indukcja ekspresji *DHN1* może świadczyć o dynamicznym zaangażowaniu tego genu w ochronę tkanek merystematycznych i różnicujących się przed uszkodzeniami wywołanymi deficytem wody. Dehydryny, jako białka LEA (Late Embryogenesis Abundant), mają zdolność wiązania jonów metali, stabilizacji błon biologicznych i białek cytoplazmatycznych, co czyni je kluczowymi elementami strategii przetrwania roślin w warunkach suszy. Wysoka ekspresja *DHN1* już na początkowych etapach stresu może wskazywać na jego potencjalną rolę jako wczesnego markera molekularnego reakcji sosny zwyczajnej na odwodnienie.

W ramach badania przeanalizowano również poziom ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w przebieg procesu ksylogenezy.

3-O-metylotransferaza kwasu kawowego (COMT) to kluczowy enzym szlaku biosyntezy ligniny, odpowiedzialny za metylację kwasu kawowego oraz 5-hydroksyferulowego, prowadzącą do powstania jednostek syringiowych (S). W badaniach

przeprowadzonych na pszenicy (*Triticum aestivum*), gen *TaCM* kodujący COMT wykazywał konstytutywną ekspresję w tkankach wegetatywnych oraz wysoką aktywność względem aldehydu 5-hydroksykoniferylowego – głównego prekursora ligniny syringylowej (Ma i Xu, 2008). Zhong i in. (2000) udowodnili, że represja genu *COMT* w roślinach transgenicznych (topola) prowadziła do selektywnego obniżenia udziału jednostek syringylowych, bez istotnego wpływu na całkowitą zawartość ligniny. Podobne wyniki uzyskano w transgenicznym tytoniu, co potwierdza, że COMT odgrywa istotną rolę w modulowaniu składu ligniny, a nie jej ilości (Ma i Xu, 2008).

Chociaż u roślin nagonasiennych, takich jak sosna zwyczajna, dominującym typem ligniny jest frakcja guajakolowa (G), to wykazano również obecność śladowych ilości ligniny syringylowej (S) – frakcji typowej dla lignin liściastych (Wagner i in. 2015) oraz ekspresję genów uczestniczących w jej biosyntezie. Ralph i in. (2015) wykazali, że transgeniczne linie *Pinus radiata*, w których ekspresji poddano geny *F5H* oraz *COMT*, były zdolne do produkcji alkoholu synapilowego i wbudowania go do polimeru ligniny. Analiza metodami spektroskopowymi (2D-NMR i GC/MS) ujawniła obecność jednostek syringylowych na poziomie do 8%, co jednoznacznie potwierdza możliwość powstania ligniny typu G/S u iglastych. Kluczową rolę w tym procesie odegrała *COMT*, której ekspresja pozwoliła na skuteczne przekształcenie pośrednich związków szlaku fenylopropanoidowego i umożliwiła syntezę SA. W analizie chemicznej ligniny odzyskanej z drewna sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), przeprowadzonej przez Khan i in. (2022), przy użyciu spektroskopii ATR-FTIR zidentyfikowano charakterystyczne pasma absorpcji odpowiadające zarówno jednostkom guajakolowym (G), jak i syringylowym (S). Wyniki te dostarczają bezpośredniego dowodu na naturalną obecność frakcji syringylowej w ligninie iglastych, mimo że jej udział jest śladowy. Co więcej, obecność i wzrost ekspresji genu *COMT* w drewnie reakcyjnym sosny nadmorskiej (*Pinus pinaster*) zostały wykazane przez Plomion i in. (2000), co potwierdza, że enzym ten bierze udział w szlaku lignifikacji także u nagonasiennych. W badaniu tym zidentyfikowano białka COMT i CCoAOMT jako elementy silnie reagujące na stres mechaniczny w ksylemie, co może sugerować ich potencjalną rolę również w odpowiedzi na inne czynniki środowiskowe, np. odwodnienie.

U nagonasiennych aktywność COMT może odpowiadać za precyzyjne dostosowanie składu ligniny do warunków środowiskowych, szczególnie w młodych tkankach i w sytuacjach stresowych. W przeprowadzonym doświadczeniu względną ekspresję genu *COMT* oceniono względem dwóch genów referencyjnych (*EF1* oraz *ACT*). W obu przypadkach zaobserwowano jedynie umiarkowany wzrost poziomu transkryptu w warunkach stresu wodnego. Analiza

względem ACT wykazała jeszcze słabiej zaznaczone zmiany – względna zmiana (fold change) nie przekraczała wartości 4,84. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o niewielkiej wrażliwości *COMT* na odwodnienie w analizowanym przedziale czasowym, co dodatkowo podkreśla różnice pomiędzy dynamiczną aktywacją genów odpowiedzi stresowej (takich jak *DHNI*) a powolniejszymi, adaptacyjnymi zmianami w szlaku lignifikacji. Choć w analizowanych warunkach ekspresja genu *COMT* nie wykazała silnych zmian, obserwacje mikroskopowe wykazały wyraźny wzrost zawartości ligniny w tkankach pędu. Można przypuszczać, że zmiany te dotyczą przede wszystkim frakcji guajakolowej (G), która dominuje u roślin nagonasiennych, takich jak sosna zwyczajna. *COMT* bierze udział głównie w syntezie ligniny syringylowej (S), obecnej u sosny jedynie w śladowych ilościach, co może tłumaczyć brak istotnych zmian ekspresji tego genu przy jednoczesnym wzroście ogólnej lignifikacji.

Gen *PIN1* (*PIN-FORMED 1*) koduje błonowy transporter auksyny, który odgrywa kluczową rolę w kierunkowym (polarnym) transporcie tego fitohormonu między komórkami. Dzięki spolaryzowanej lokalizacji białka *PIN1* w błonie plazmatycznej, roślina może precyzyjnie kontrolować przepływ auksyny w tkankach, co warunkuje procesy morfogenezy i różnicowania, w tym ksylogenezę.

Jak podkreślają Luschnig i Friml (2024), *PIN1* stanowi centralny element mechanizmu dystrybucji auksyny w organizmie roślinnym, integrując zarówno sygnały rozwojowe, jak i środowiskowe. Polarny transport auksyny regulowany przez *PIN1* determinuje lokalne gradienty hormonalne, które sterują miejscem inicjacji i przebiegiem różnicowania wiązek przewodzących.

Wykazano, że wzór ekspresji *PIN1* poprzedza rozwój tkanek przewodzących (Scarpella et al., 2006), a jego zaburzenie prowadzi do nieprawidłowego rozwoju ksylemu. Lokalizacja białka *PIN1* w błonach komórek kambialnych i parenchymatycznych odpowiada za przepływ IAA do stref różnicowania komórek naczyniowych. Również czynniki stresowe, takie jak odwodnienie, mogą wpływać na ekspresję *PIN1* oraz jego relokację w błonie, co modyfikuje przebieg ksylogenezy i adaptacyjnych zmian w strukturze ksylemu.

W niniejszym badaniu wykazano obecność transkryptu *PIN1* w pędach siewek sosny zwyczajnej w warunkach suszy, co może wskazywać na jego udział w regulacji rozwoju ksylemu w odpowiedzi na deficyt wody. Pomimo braku dostępnych danych transkryptomicznych potwierdzających ekspresję genu *PIN1* u sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), w niniejszym badaniu uzyskano pozytywny sygnał ekspresji zarówno w siewkach kontrolnych, jak i w warunkach stresu wodnego. Do reakcji qPCR zastosowano startery

zaprojektowane na podstawie sekwencji genu *PIN1* z *Pinus radiata*, co wskazuje na wysoki poziom podobieństwa (konserwatywność) tej sekwencji w obrębie rodzaju *Pinus*. Wyniki te mogą świadczyć o aktywnej roli *PIN1* w transporcie auksyny oraz potencjalnym udziale w regulacji procesów ksylogenezy. W analizowanych warunkach pomimo, że zaobserwowano obecność transkryptu genu *PIN1* w pędach siewek, poziom jego ekspresji nie wykazywał istotnych różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi a poddanymi odwodnieniu. Może to sugerować, że ekspresja *PIN1* w tej fazie rozwojowej nie ulega regulacji pod wpływem krótkotrwałego deficytu wody, lub że ewentualne zmiany zachodzą na poziomie translacji, lokalizacji białka lub w dłuższej skali czasowej.

Ekspresja *PIN1* ulega zmianie w odpowiedzi na stres wodny u różnych roślin okrytozalążkowych, takich jak *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* czy *Liriodendron chinense*, gdzie obserwowano jej wzrost lub spadek w zależności od tkanki i warunków stresu (Bawa i in. 2022, Liu i in. 2022, Wang i in. 2019, Wu i in. 2021). U *Pinus sylvestris* wykazano, że zarówno wzrost elongacyjny jak i podziały komórek kambium są kontrolowane przez szlak oparty na przepływie bazypetalnym auksyn oraz stymulowanie ekspresji genu kodującego transporter PIN1 przez gibereliny (Wang i in. 1997). W niniejszym eksperymencie w przypadku sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) poziom transkryptu *PIN1* pozostał stabilny, co może wskazywać na bardziej konstytutywną funkcję genu w tej grupie roślin. Rola *PIN1* może być związana z utrzymywaniem biegunowości lub wzrostu tkanek, co może tłumaczyć brak istotnych zmian jego ekspresji w analizowanych warunkach stresu wodnego.

Geny z rodziny HD-ZIP III (Homeodomain Leucine Zipper klasy III) kodują czynniki transkrypcyjne odgrywające kluczową rolę w różnicowaniu tkanek przewodzących, w tym w procesie ksylogenezy. Geny te zostały szczegółowo scharakteryzowane u roślin zielnych, głównie *Arabidopsis thaliana*, gdzie pełnią kluczową rolę w różnicowaniu tkanek przewodzących i tworzeniu ściany wtórnej.

Wszystkie białka z tej rodziny zawierają dwie charakterystyczne domeny: homeodomenę (HD), odpowiadającą za wiązanie DNA, oraz domenę leucynowego zamka (LZ), umożliwiającą dimeryzację białek. Na podstawie różnic w strukturze i funkcji, geny te zostały podzielone na cztery klasy: HD-ZIP I–IV. Białka należące do klasy HD-ZIP III wyróżniają się dodatkowo obecnością domeny START, uczestniczącej prawdopodobnie w wiązaniu lipidów, oraz domeny MEKHLA, która bierze udział w odbieraniu sygnałów fizykochemicznych. Geny HD-ZIP III są ewolucyjnie konserwowane i obecne we wszystkich głównych liniach roślin lądowych (Wang i in. 2021, Li i in. 2022).

U *Arabidopsis thaliana* do tej grupy należy pięć genów: *PHB*, *PHV*, *REV*, *ATHB8* i *CNA*, które pełnią zarówno komplementarne, jak i antagonistyczne role w rozwoju rośliny. Regulują one m.in. embriogenezę, tworzenie merystemów, ustalanie biegunowości organów i różnicowanie tkanek przewodzących – w tym ksylemu. Ekspresja HD-ZIP III podlega ścisłej regulacji potranskrypcyjnej za pośrednictwem mikroRNA miR165/166. Mutacje znoszące sekwencje wiązania tego miRNA prowadzą do silnych, dominujących zmian fenotypowych, co podkreśla znaczenie precyzyjnej kontroli tych czynników (Miyashima i in. 2013, Du i Wang 2015).

Badania na *Arabidopsis thaliana* wykazały, że rozwój ksylemu kontrolowany przez czynniki HD-ZIP III zależy od lokalnej biosyntezy auksyny, opartej na szlaku tryptofanowym. Zakłócenie tego procesu prowadziło do zmienionego wzorca różnicowania komórek ksylemu (Ursache et al., 2014). Najnowsze dane uzyskane metodą transkryptomiki pojedynczych komórek potwierdzają te obserwacje: Ekspresja HD-ZIP III promuje wzrost komórek ksylemu oraz ich różnicowanie, co stanowi dowód na ich centralną rolę w regulacji rozwoju tkanek przewodzących u roślin naczyniowych. Wyniki te, choć uzyskane na modelowej roślinie zielnej, wskazują na istotną funkcję HD-ZIP III, która może być również obecna u gatunków drzewiastych.

Badania przeprowadzone na topoli (*Populus trichocarpa*) wykazały, że gen *PtrHB4*, należący do rodziny *HD-ZIP III*, odgrywa kluczową rolę w rozwoju kambium wiązkowego i międzywiązkowego. Jak wykazali Zhu i in. (2018), represja *PtrHB4* prowadziła do zaburzeń w formowaniu kambium międzywiązkowego, co skutkowało nieprawidłowym rozwojem wtórnych tkanek przewodzących. Z kolei jego nadekspresja indukowała aktywność kambium oraz różnicowanie komórek ksylemu, również w miejscach ektopowych. Autorzy zaproponowali, że *PtrHB4* może działać poprzez szlak sygnalizacyjny auksyny, wpływając m.in. na ekspresję genów PIN1 i WOX4. Wyniki te potwierdzają, że *HD-ZIP III* nie tylko kontrolują rozwój kambium w sposób typowy dla roślin zielnych, ale również pełnią funkcje specyficzne dla roślin drzewiastych, w tym modulację formowania ciągłego pierścienia kambialnego.

U roślin nagonasiennych, takich jak świerk (*Picea spp.*) czy sosna (*Pinus spp.*), wykazano ekspresję tych genów w różnicującym się drewnie wtórnym, co potwierdza ich zaangażowanie w rozwój tkanki naczyniowej tych roślin (Côté et al., 2010). Badania prowadzone na *Pinus canariensis* wskazują, że ekspresja *HD-ZIP III* wzrasta w późniejszych etapach wzrostu wierzchołkowego, podczas inicjacji przyrostu wtórnego i lignifikacji (Chano et al., 2020).

Chociaż *HD-ZIP III* są klasycznie postrzegane jako regulatory rozwoju, coraz więcej badań wskazuje na ich udział w odpowiedzi na stresy abiotyczne. U roślin zielnych wykazano, że poziom ekspresji tych genów wzrasta w warunkach suszy, zasolenia czy niskiej temperatury. Mogą one pośrednio uczestniczyć w adaptacji roślin do deficytu wody poprzez modyfikacje w strukturze tkanek przewodzących i regulację hormonalną. W transkryptomicznej analizie *Nicotiana tabacum* poddanej krótkoterminowemu stresowi suszy zaobserwowano aktywację wielu rodzin czynników transkrypcyjnych, w tym WRKY, AP2/ERF oraz HD-ZIP, z których część wykazywała rodzinowo specyficzne wzorce ekspresji (Rabara i in., 2015). Zmiany te sugerują, że odpowiedź transkrypcyjna na deficyt wody może być modulowana nie tylko przez powszechne szlaki sygnałowe, ale również przez czynniki typowe dla danej grupy taksonomicznej, co podkreśla potencjalną rolę HD-ZIP również u innych gatunków.

Chociaż najwięcej danych eksperymentalnych dotyczących odpowiedzi *HD-ZIP* na stres abiotyczny pochodzi z badań nad klasą I (np. *ATHB5*, *ATHB7* i *ATHB12* u *Arabidopsis*, indukowanych przez suszę i ABA; Henriksson i in., 2005; Johansson i in. 2001), to doniesienia te podkreślają potencjalne znaczenie czynników *HD-ZIP* również w innych klasach tej rodziny, w tym HD-ZIP III. Zważywszy na ich znaną rolę w rozwoju tkanki przewodzącej, warto pogłębić badania nad ich udziałem w adaptacyjnej odpowiedzi roślin na stres środowiskowy.

Jak pokazano wcześniej, ekspresja genu z rodziny *HD-ZIP III* (*HDZ33*) została przeanalizowana względem dwóch genów referencyjnych: *EF1* oraz *ACT*. W obu przypadkach zaobserwowano zmiany w poziomie transkryptu w odpowiedzi na stres wodny. W kilku punktach pomiarowych uzyskano wzrost ekspresji – (fold change do ~23-krotnej indukcji). Szczególnie silna aktywacja miała miejsce w dniach 5-7 co może wskazywać na zaangażowanie *HD-ZIP III* w adaptacyjne procesy związane z różnicowaniem tkanek przewodzących w warunkach deficytu wody.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami przeprowadzonymi m.in. na *Arabidopsis thaliana* i *Populus* spp., w których wykazano, że geny *HD-ZIP III* biorą udział nie tylko w rozwoju ksylemu, lecz także mogą być aktywowane w odpowiedzi na stresy abiotyczne, w tym suszę. Obecność indukcji w młodych siewkach sosny zwyczajnej sugeruje, że *HDZ33* może pełnić podobną funkcję również u gatunków nagonasiennych, co potwierdza jego potencjalną rolę w regulacji adaptacyjnej morfogenezy tkanek przewodzących w warunkach odwodnienia.

U sosny zwyczajnej opisano kilka innych genów, które pod wpływem silnego stresu suszy wykazały istotny statystycznie wzrost ekspresji. Wśród nich wymienić można *PAL*

kodujący amoniakoliazę L-fenylalaniny, enzym zaangażowany w biosyntezę związków fenolowych oraz również w biosyntezę ligniny, a także gen *abaH*, którego ekspresja może być indukowana kwasem abscysynowym (ABA), czyli hormonem roślinnym odpowiedzialnym m.in. za zamykanie aparatów szparkowych jako element strategii obronnej przed utratą wody (Carvalho i in. 2017).

Podsumowując, wśród genów zaangażowanych zarówno w proces formowania ksylemu, jak i zmieniających poziom ekspresji pod wpływem deficytu wody u *Pinaceae*, wyróżniamy głównie geny (w tym czynniki transkrypcyjne) związane ze szlakiem fenylopropanoidowym i biosyntezą ligniny (*PAL*, *COMT*, *MYB*), a także inne czynniki transkrypcyjne regulujące proces powstawania tkanki drewna na różnych etapach (np. *NAC*, *bZIP*). W niniejszej pracy zbadano wybrane geny związane zarówno z formowaniem tkanki ksylemu, jak i z odpowiedzią na stres odwodnienia w początkowych etapach rozwoju siewki sosny.

Jak wykazały badania na syberyjskiej sosnie zwyczajnej (Belokopytova i in. 2020), procesy prowadzące do powstawania tkanki drzewnej, a więc podziały komórek, ich powiększanie oraz odkładanie wtórnej ściany komórkowej, nie zachodzą zupełnie niezależnie od siebie. Istnieją dowody na to, że zjawiska te mogą być regulowane przez wspólne mechanizmy, zwłaszcza w przypadku reakcji na bodźce klimatyczne, takie jak stres suszy. Szczególnie podziały i wzrost komórek prekursorowych drewna wydają się mieć wiele wspólnego, co może mieć wpływ na to, że są bardziej wrażliwe na niedobór wody, niż proces formowania ścian komórkowych. Porównanie wyników może sugerować, że niektóre zmiany morfologiczne (np. w strukturze komórek) pojawiają się bardzo wcześnie i mogą być traktowane jako wczesne markery stresu. Mikrostrukturalne zmiany w ścianach komórkowych, zmiany poziomu markerów stresowych oraz genów zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy mogą wskazywać na bardzo wczesne reakcje adaptacyjne lub potencjalnie długoterminowe konsekwencje fizjologiczne.

Reakcja drzew iglastych na niską dostępność wody obejmuje różne procesy fizjologiczne i mechanizmy molekularne. Oczekuje się, że adaptacje roślin do warunków suszy będą zyskiwać coraz większe znaczenie w najbliższej przyszłości ze względu na modele klimatyczne przewidujące wydłużenie czasu trwania i nasilenie okresów suszy w wielu regionach. Pomimo złożoności omawianych mechanizmów poczyniono znaczne postępy w zrozumieniu reakcji roślin na suszę w ostatnich dekadach. Było to możliwe szczególnie dzięki

wykorzystaniu zaawansowanych technologii ułatwiających zidentyfikowanie i dokładne przeanalizowanie licznych genów i szlaków metabolicznych kontrolujących odpowiedź na stres. Poznanie wszystkich aspektów tej odpowiedzi pozostaje jednak nieuchwytnie, zwłaszcza że strategie adaptacji i przetrwania niekorzystnych warunków mogą różnić się w zależności od gatunku, typu gleby czy intensywności czynnika stresowego. Dlatego tak istotne jest kompleksowe podejście, łączące badania fizjologiczne, biochemiczne i molekularne. Takie podejście umożliwia nie tylko dokładniejsze poznanie mechanizmów odpowiedzi roślin na deficyt wody, ale również identyfikację kluczowych szlaków adaptacyjnych, które mogą stać się celem przyszłych działań hodowlanych ukierunkowanych na zwiększenie odporności roślin na stresy środowiskowe.

Aby lepiej zrozumieć mechanizmy adaptacji drzew iglastych do stresu suszy, konieczne jest połączenie wyników badań z różnych dziedzin oraz uwzględnienie wszystkich czynników wpływających na odpowiedź roślin w warunkach naturalnych. Wśród tych czynników istotne znaczenie mają m.in. właściwości gleby, skład mikrobiomu ryzosfery, zmienność warunków klimatycznych oraz etap rozwoju roślin. Tylko podejście oparte na integracji różnorodnych danych może umożliwić pełniejsze zrozumienie złożonych procesów adaptacyjnych drzew iglastych i stworzyć podstawy do skutecznego wykorzystania tej wiedzy w ochronie oraz poprawie kondycji lasów w obliczu zmieniającego się klimatu.

Ograniczenia i perspektywy badań

Do głównych ograniczeń niniejszego badania należy zaliczyć niewielką liczbę powtórzeń biologicznych w analizie ekspresji genów oraz brak pełnej walidacji efektywności wszystkich par starterów, co może wpływać na dokładność ilościowej oceny ekspresji.

Ponadto oznaczenia anionorodnika ponadtlenkowego metodą NBT odzwierciedlają zmiany intensywności reakcji, a nie bezwzględne stężenia, co ogranicza możliwość bezpośredniego porównania wyników z danymi literaturowymi.

Dodatkowym czynnikiem wpływającym na interpretację wyników jest potencjalna zmienność fizjologiczna pomiędzy osobnikami oraz nakładanie się efektów stresowych i procesów rozwojowych.

W przyszłych badaniach wskazane byłoby zwiększenie liczby powtórzeń biologicznych, rozszerzenie analizy o dodatkowe markery molekularne oraz zastosowanie metod umożliwiających bardziej precyzyjne oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu.

Może można w dyskusji dodać krótki podrozdział „Ograniczenia i perspektywy” z 4–6 punktami (qPCR, n, NBT, RWC, kontrola środowiska, tkankowość), to poziom dojrzałości tego rozdziału wzrośnie zauważalnie.

6. STWIERDZENIA I WNIOSKI

1. Analiza poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) wskazuje na obecność trendu zmian w przebiegu eksperymentu, sugerującego wpływ stresu odwodnienia na intensywność peroksydacji lipidów w siewkach sosny. Wzrost poziomu TBARS w dniach 1–7 zarówno w epikotylach, jak i w hipokotylach i korzeniach może wskazywać na narastające uszkodzenia struktur błonowych w odpowiedzi na pogłębiający się stres suszy. Najwyższe wartości poziomu TBARS obserwowano w 7. dniu doświadczenia, co sugeruje możliwą kumulację uszkodzeń oksydacyjnych w wyniku długotrwałego braku wody. Podanie wody w 8. dniu skutkowało obniżeniem poziomu TBARS do wartości zbliżonych lub niższych niż u roślin kontrolnych, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów naprawczych oraz redukcji stresu oksydacyjnego po nawodnieniu. Jednak ze względu na dużą zmienność wyników pomiędzy powtórzeniami biologicznymi oraz brak istotności statystycznej różnic pomiędzy grupami (test U Manna–Whitneya, $p > 0,05$), obserwowane zmiany należy interpretować ostrożnie. Różnice poziomu TBARS między dniami 5 i 7 mogą odzwierciedlać indywidualne reakcje siewek na stres suszy lub sugerować różnice w tempie uruchamiania mechanizmów adaptacyjnych.
2. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) u siewek sosny w warunkach stresu suszy, przy czym zmiany te miały charakter trendu i w większości punktów czasowych nie osiągnęły istotności statystycznej ($p > 0,05$). Najwyższe wartości obserwowano w dniu 7, co odpowiadało maksymalnemu nasileniu stresu wodnego. Jednocześnie odnotowano

znaczną zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, co znalazło odzwierciedlenie w wysokich wartościach odchylenia standardowego.

Istotną statystycznie różnicę pomiędzy wariantem kontrolnym a stresowym stwierdzono jedynie w dniu 8 w analizowanej frakcji dolnych części siewek (hipokotyle i korzenie), gdzie poziom $O_2^{\bullet-}$ był niższy u roślin wcześniej poddanych stresowi ($p = 0,030$). Obserwacja ta może być związana ze zmianą warunków fizjologicznych po nawodnieniu. W siewkach kontrolnych poziom $O_2^{\bullet-}$ pozostawał względnie stabilny w czasie trwania doświadczenia. Wyższe wartości obserwowane w dolnych częściach siewek w porównaniu do epikotyli mogą sugerować zróżnicowaną odpowiedź poszczególnych tkanek na stres wodny.

3. Wzrost stężenia nadtlenu wodoru (H_2O_2) w siewkach sosny w dniu 7 eksperymentu może świadczyć o aktywacji reakcji stresowej w odpowiedzi na odwodnienie tkanek. Obniżenie poziomu H_2O_2 po nawodnieniu sugeruje działanie mechanizmów antyoksydacyjnych przywracających równowagę oksydoredukcyjną. Jednak mimo widocznych trendów w analizowanych punktach czasowych, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy siewkami kontrolnymi a poddanymi stresowi wodnemu (test U Manna–Whitneya, $p > 0,05$). Może to wynikać z wysokiej zmienności biologicznej pomiędzy powtórzeniami oraz ograniczonej liczby replik, co ogranicza moc statystyczną testów. Zaobserwowana zmienność wskazuje również na możliwe różnice indywidualne w odpowiedzi siewek na stres suszy oraz potencjalną obecność naturalnych różnic fizjologicznych pomiędzy osobnikami. Wynik wskazuje na trend zgodny z narastaniem stresu, lecz przy $p > 0,05$ nie może stanowić samodzielnej podstawy do potwierdzania hipotez.
4. Analiza poziomu ekspresji genów *DHNI*, *PINI*, *COMT* i *HDZ33* metodą Real-Time qPCR wskazuje na zróżnicowany charakter odpowiedzi transkrypcyjnej badanych genów na stres wodny.

W przypadku genu *DHNI*, zaobserwowano wyraźny trend wzrostu ekspresji, osiągający maksimum w 5. dniu doświadczenia, po którym następował spadek poziomu transkryptu w kolejnych dniach. Może to odzwierciedlać wczesną odpowiedź roślin na stres osmotyczny.

Gen ***PIN1***, wykazywał najwyższy poziom ekspresji w początkowej fazie eksperymentu (dzień 1), następnie obserwowano jej spadek w dniach 5–7 oraz ponowny wzrost po nawodnieniu, co może być związane ze zmianami w regulacji transportu auksyn w odpowiedzi na stres.

W przypadku genu ***COMT***, obserwowano umiarkowany wzrost ekspresji do około 3.–5. dnia doświadczenia, po którym następował jej spadek, co może wskazywać na przejściową aktywację procesów związanych z biosyntezą ligniny.

Ekspresja genu ***HDZ33*** wykazywała stopniowy trend wzrostowy w trakcie trwania eksperymentu, osiągając najwyższe wartości w końcowych dniach (dzień 7–8), co może sugerować jego udział w późniejszych etapach odpowiedzi adaptacyjnej.

Pomimo obserwowanych zmian o charakterze biologicznie uzasadnionych trendów, różnice pomiędzy wariantami kontrolnymi i stresowymi nie osiągnęły istotności statystycznej (test U Manna–Whitneya, $p > 0,05$), co ogranicza możliwość ich jednoznacznej interpretacji.

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu podkreślają złożoność odpowiedzi sosny na stres wodny, wskazując na potencjalny udział zarówno mechanizmów szybkich (transport hormonalny), jak i długoterminowych (ochrona strukturalna i regulacja ekspresji genów).

Przedstawione wnioski mają charakter opisujący obserwowane tendencje i wymagają potwierdzenia w badaniach o większej liczbie powtórzeń biologicznych oraz zwiększonej mocy statystycznej.

7. LITERATURA

1. **Akiyoshi, N., Nakano, Y., Sano, R., Kunigita, Y., Ohtani, M., & Demura, T. (2020).** Involvement of VNS NAC-domain transcription factors in tracheid formation in *Pinus taeda*. *Tree physiology*, 40(6), 704-716.
2. **Aloni, R. (2010).** The induction of vascular tissues by auxin. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*, 485-518.
3. **Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri C., Höfte H., Plazinski J., Birch R., Cork A., Glover J., Redmond J., Williamson, R. E. (1998).** Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 279(5351), 717–720. doi:10.1126/science.279.5351.717
4. **Baldi, P., & La Porta, N. (2022).** Toward the genetic improvement of drought tolerance in conifers: An integrated approach. *Forests*, 13(12), 2016.
5. **Barceló, A. R. (1998).** Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Annals of Botany*, 82(1), 97-103.
6. **Bawa, G., Liu, Z., Wu, R., Zhou, Y., Liu, H., Sun, S. et al. (2022).** PIN1 regulates epidermal cells development under drought and salt stress using single-cell analysis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1043204.
7. **Belokopytova, L. V., Fonti, P., Babushkina, E. A., Zhirnova, D. F., & Vaganov, E. A. (2020).** Evidences of Different Drought Sensitivity in Xylem Cell Developmental Processes in South Siberia Scots Pines. *Forests*, 11(12), 1294. doi:10.3390/f11121294
8. **Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H., & Mansfield, J. W. (1997).** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell*, 9(2), 209-221.
9. **Blaim, K. (1968).** Substancje pektynowe i ich znaczenie biologiczne. *Postępy Nauk Rolniczych*, 15(2).
10. **Bomal, C., Bedon, F., Caron, S., Mansfield, S.D., Levasseur, C., Cooke, J.E.K., Blais, S., Tremblay, L., Morency, M.J., Pavy, N., Grima-Pettenati, J., Séguin, A., MacKay, J. (2008).** Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. *J Exp Bot* 59: 3925–3939
11. **Bréda, N., Huc, R., Granier, A., & Dreyer, E. (2006).** Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*, 63(6), 625-644.

12. **Carvalho, A., Pavia, I., Fernandes, C., Pires, J., Correia, C., Bacelar, E., ... & Lima-Brito, J. (2017).** Differential physiological and genetic responses of five European Scots pine provenances to induced water stress. *Journal of plant physiology*, 215, 100-109.
13. **Cassab, G. I. (1998).** Plant cell wall proteins. *Annual review of plant biology*, 49(1), 281-309.
14. **Cato, C.L., McMillan, L., Donaldson, L., Richardson, T., Echt, C., Gardner, R. (2006).** Wood formation from the base to the crown in *Pinus radiata*: gradients of tracheid wall thickness, wood density, radial growth rate and gene expression. *Plant Mol Biol* 60:565–581
15. **Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M. et al. (2008).** Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* 20: 1519–1537
16. **Chaudhry, S., Sidhu, G. P. S. (2021).** Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, 41(1), 1-31.
17. **Chano, V., Collada, C., Soto, A. (2017).** Transcriptomic analysis of wound xylem formation in *Pinus canariensis* . *BMC Plant Biology*, 17(1). doi:10.1186/s12870-017-1183-3
18. **Chano, V., Gil-Pelegrín, E., López, R., Pita, P., Soto, Á. (2020).** Wood development regulators involved in apical growth in *Pinus canariensis*. *Plant Biology*, 22(4), 573–581. <https://doi.org/10.1111/plb.13126>
19. **Chano, V., López, R., Pita, P., Collada, C., Soto, Á. (2015).** Proliferation of axial parenchymatic xylem cells is a key step in wound closure of girdled stems in *Pinus canariensis*. *BMC Plant Biology*, 15(1), 64. doi:10.1186/s12870-015-0447-z
20. **Chmielowska-Bąk J, Izbiańska K, Deckert J (2015).** Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Front. Plant Sci.* 6:405.
doi: 10.3389/fpls.2015.00405
21. **Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S.K. (2013).** Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4), e23681. doi:10.4161/psb.23681

22. **Christenhusz, M. J. M., Reveal, J. L., Farjon, A., Gardner, M. F., Mill, R. R., & Chase, M. W. (2011).** A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*, 19(1), 55. doi:10.11646/phytotaxa.19.1.3
23. **Côté, C., Guillet-Claude, C., Grima-Pettenati, J., Depège-Fargeix, N. (2010).** Identification and expression analysis of HD-Zip genes in the gymnosperm *Picea glauca*. *BMC Plant Biology*, 10, 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-312>
24. **Cuny, H. E., Rathgeber, C. B. (2016).** Xylogenesis: coniferous trees of temperate forests are listening to the climate tale during the growing season but only remember the last words!. *Plant Physiology*, 171(1), 306-317.
25. **Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., Abrams, S. R. (2010).** Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, 61(1), 651-679.
26. **Dalessandro, G., Piro, G., Northcote, D.H. (1988).** A membrane-bound enzyme complex synthesising glucan and glucomannan in pine tissues. *Planta* 175: 60-70.
27. **De Meester, B., Vanholme, R., Mota, T., & Boerjan, W. (2022).** Lignin engineering in forest trees: from gene discovery to field trials. *Plant Communications*, 100465.
28. **De Micco, V., Carrer, M., Rathgeber, C.K., Julio Camarero, J., Voltas, J., Cherubini, P., Battipaglia, G. (2019).** From xylogenesis to tree rings: wood traits to investigate tree response to environmental changes, *IAWA Journal*, 40(2), 155-182. doi: <https://doi.org/10.1163/22941932-40190246>
29. **Delmer, D. P., Amor Y. (1995).** Cellulose Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 7(7), 987–1000. doi:10.1105/tpc.7.7.987
30. **Doke, N. (1983).** Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*, 23(3), 359-367.
31. **Donaldson, L. A. (2001).** Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57(6), 859-873.
32. **Du, M., Ding, G., & Cai, Q. (2018).** The transcriptomic responses of *Pinus massoniana* to drought stress. *Forests*, 9(6), 326.
33. **Du, Q., Wang, H. (2015).** The role of HD-ZIP III transcription factors and *miR165/166* in vascular development and secondary cell wall formation. *Plant Signaling & Behavior*, 10(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1078955>

34. **Eckert, C., Sharmin, S., Kogel, A., Yu, D., Kins, L., Strijkstra, G. J., Polle, A. (2019).** What Makes the Wood? Exploring the Molecular Mechanisms of Xylem Acclimation in Hardwoods to an Ever-Changing Environment. *Forests*, 10(4), 358.
35. **Eilmann, B., Zweifel, R., Buchmann, N., Fonti, P., Rigling, A. (2009).** Drought-induced adaptation of the xylem in Scots pine and pubescent oak. *Tree Physiology*, 29(8), 1011–1020. doi:10.1093/treephys/tpp035
36. **Fagerstedt, K., Saranpää, P., Piispanen, R. (1998).** Peroxidase Activity, Isoenzymes and Histological Localisation in Sapwood and Heartwood of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Journal of Forest Research*, 3(1), 43–47. doi:10.1007/bf02760292
37. **Fajstavr, M., Paschová, Z., Giagli, K., Vavrčík, H., Gryc, V., & Urban, J. (2018).** Auxin (IAA) and soluble carbohydrate seasonal dynamics monitored during xylogenesis and phloemogenesis in Scots pine. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 11(5), 553.
38. **Fukuda, H. (1996).** Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996 47:299-325.
39. **Funada, R., Yamagishi, Y., Begum, S., Kudo, K., Nabeshima, E., Nugroho, W. D., Nakaba, S. (2016).** Xylogenesis in Trees: From Cambial Cell Division to Cell Death. *Secondary Xylem Biology*, 25–43.
40. **Funada, R., Yamagishi, Y., Begum, S., Kudo, K., Nabeshima, E., Nugroho, W. D., et al (2016).** Xylogenesis in Trees: From Cambial Cell Division to Cell Death. *Secondary Xylem Biology*, 25–43. doi:10.1016/b978-0-12-802185-9.00002-4
41. **Geng, D., Chen, P., Shen, X., Zhang, Y., Li, X., Jiang, L., ... Guan, Q. (2018).** MdMYB88 and MdMYB124 enhance drought tolerance by modulating root vessels and cell walls in apple. *Plant Physiology*, 178(3), 1296-1309.
42. **Gričar, J., Prislan, P., Gryc, V., Vavrčík, H., de Luis, M., Čufar, K. (2014).** Plastic and locally adapted phenology in cambial seasonality and production of xylem and phloem cells in *Picea abies* from temperate environments. *Tree Physiology*, 34(8), 869–881.
43. **Guerriero G., Sergeant K., Hausman J.-F. (2014).** Wood biosynthesis and typologies: a molecular rhapsody. *Tree Physiology* vol. 34: 839-855
44. **Hafrén, J., Daniel, G., & Westermarck, U. (2000).** The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris*. *Iawa Journal*, 21(2), 157-168.

45. **Han, F., Wang, P., Chen, X., Zhao, H., Zhu, Q., Song, Y., ... & Niu, S. (2023).** An ethylene-induced NAC transcription factor acts as a multiple abiotic stress responder in conifer. *Horticulture Research*, 10(8), uhad130.
46. **Han, X., Zhao, Y., Chen, Y., Xu, J., Jiang, C., Wang, X., ... Zhang, J. (2022).** Lignin biosynthesis and accumulation in response to abiotic stresses in woody plants. *Forestry Research*, 2, 9.
47. **Hayashi, T., Kato, Y., Matsuda, K. (1981).** Biosynthesis of Xyloglucan in Suspension-Cultured Soybean Cells. An Assay Method for Xyloglucan Xylosyltransferase and Attempted Synthesis of Xyloglucan from UDP-D-Xylose. *The Journal of Biochemistry* 89: 325–328.
48. **Hejnowicz, Z. (2002).** Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Organy wegetatywne. PWN, Warszawa 1980, 2002.
49. **Henriksson, E., Olsson, A. S., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engström, P., Söderman, E. (2005).** Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant physiology*, 139(1), 509-518.
50. **Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, S. et al. (2019).** Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under Drought Conditions. *Plant Abiotic Stress Tolerance*, 207–219. doi:10.1007/978-3-030-06118-0_9
51. **Johannesson, H., Wang, Y., Engström, P. (2001).** DNA-binding and dimerization preferences of Arabidopsis homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant molecular biology*, 45, 63-73.
52. **Kalev, N., Aloni, R. (1998).** Role of auxin and gibberellin in regenerative differentiation of tracheids in *Pinus pinea* seedlings. *New Phytologist*, 138(3), 461–468. doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00119.x
53. **Kamińska-Rożek, E., Pukacki, P. M. (2004).** Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 26, 431-442.
54. **Katainen, H. S., Karjalainen, R., Mäkinen, E., Jokinen, J., Kellomäki, S. (1984).** Effects of SO₂ on photosynthesis and peroxidase activity in Scots pine needles. *European journal of forest pathology*, 14(1), 33-42.
55. **Khan S, Rauber D, Shanmugam S, Kay CWM, Konist A, Kikas T. (2022).** Efficient Lignin Fractionation from Scots Pine (*Pinus sylvestris*) Using Ammonium-Based Protic

- Ionic Liquid: Process Optimization and Characterization of Recovered Lignin. Polymers (Basel). Oct 31;14(21):4637. PMID: 36365629; PMCID: PMC9657931.
56. **Kieliszewska-Rokicka, B. (1989).** Effect of treating Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings with phytohormone on the growth of the root system and on the peroxidase and IAA oxidase enzyme activities in roots. *Arboretum Kórnickie*, 32, 207-219.
 57. **Kontunen-Soppela, S., & Laine, K. (2001).** Seasonal fluctuation of dehydrins is related to osmotic status in Scots pine needles. *Trees*, 15, 425-430.
 58. **Korotaeva, N., Romanenko, A., Suvorova, G., Ivanova, M. V., Lomovatskaya, L., Borovskii, G., & Voinikov, V. (2015).** Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles. *Photosynthesis Research*, 124(2), 159–169. doi:10.1007/s11120-015-0112-2
 59. **Kozakiewicz, P. (2012).** *Fizyka drewna w teorii i zadaniach*. Wyd. IV zmienione, wyd. SGGW, Warszawa.
 60. **Kukkola, E., Rautio, P., Huttunen, S. (2000).** Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 43(3), 197–210. doi:10.1016/s0098-8472(99)00057-x
 61. **Kumar, M., Wightman, R., Atanasov, I., Gupta, A., Hurst, C. H., Hemsley, P. A., Turner, S. (2016).** S-Acylation of the cellulose synthase complex is essential for its plasma membrane localization. *Science*, 353(6295), 166–169. doi:10.1126/science.aaf4009
 62. **Kuroyama, H., Tsumuraya, Y. (2001).** A xylosyltransferase that synthesizes β -(1→4)-xylans in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta* 213: 231-240.
 63. **Labudda, M. (2013).** Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland. <http://www.e-wydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342>.
 64. **Lev-Yadun S., Sederoff L. (2000).** Pines as Model Gymnosperms to Study Evolution, Wood Formation, And Perennial Growth. *J Plant Growth Regul.* 19: 290–305.
 65. **Li, J., West, J. B., Hart, A., Wegrzyn, J. L., Smith, M. A., Domec, J. C., ... & Casola, C. (2021).** Extensive variation in drought-induced gene expression changes between loblolly pine genotypes. *Frontiers in Genetics*, 12, 661440.
 66. **Li, X., Wu, H.X., Southerton, S.G. (2011).** Transcriptome profiling of wood maturation in *Pinus radiata* identifies differentially expressed genes with implications in juvenile and mature wood variation. *Gene* 487:62–71

67. **Li, Y., Yang, Z., Zhang, Y., Guo, J., Liu, L., Wang, C., ... Han, G. (2022).** The roles of HD-ZIP proteins in plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 13, 1027071. doi: 10.3389/fpls.2022.1027071
68. **Liu, Y., Jiang, C., Liang, Y., Wang, Y., Zhao, Z. (2022).** The PIN1 auxin efflux carrier regulates plant epidermal cell development under drought and salt stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(24), 15859.
69. **Liang E., Balducci L., Ren P., Rossi S. (2016).** Xylogenesis and Moisture Stress. In : *Secondary Xylem Biology 1* (3), Elsevier.
70. **Lip, S., Kurowska, M., Szarejko, I. (2022).** Rodzina czynników transkrypcyjnych NAC a zwiększenie tolerancji na stres niedoboru wody u roślin. *Postępy Biochemii* 59 (3).
71. **Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., Li, D. (2017).** Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in plant science*, 8, 1018.
72. **Liu, B., Wang, J. P. (2020).** Tracheid-associated transcription factors in loblolly pine. *Tree Physiology*, 40(6), 700-703.
73. **Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
74. **Luo, L., Li, L. (2022).** Molecular understanding of wood formation in trees. *Forestry Research*, 2(1).
75. **Luschnig, C., Friml, J. (2024).** Over 25 years of decrypting PIN-mediated plant development. *Nature Communications*, 15, 9904.
76. **Lyczakowski, J. J., Yu, L., Terrett, O. M., Fleischmann, C., Temple, H., Thorlby, G., ... Dupree, P. (2021).** Two conifer GUX clades are responsible for distinct glucuronic acid patterns on xylan. *New Phytologist*, 231(5), 1720-1733.
77. **Ma, R., Xu, Y. (2008).** Characterization of a caffeic acid O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8–9), 636–645.
78. **Mackay, D. S., Savoy, P. R., Grossiord, C., Tai, X., Pleban, J. R., Wang, D. R., ... Sperry, J. S. (2019).** Conifers depend on established roots during drought: results from a coupled model of carbon allocation and hydraulics. *New Phytologist*, 225(2), 679-692.
79. **Maffei, M. E. (2025).** Plant Quantum Biology: The Quantum Dimension of Plant Responses to Stress. *Plant Stress*, 100930.

80. **Markkola, A. M., Tarvainen, O., Ahonen-Jonnarth, U., Strömmer, R. (2002).** Urban polluted forest soils induce elevated root peroxidase activity in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Environmental Pollution*, 116(2), 273-278.
81. **Matallana-Ramirez, L. P., Whetten, R. W., Sanchez, G. M., & Payn, K. G. (2021).** Breeding for climate change resilience: a case study of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in North America. *Frontiers in plant science*, 12, 606908.
82. **McCarthy, R.L., Zhong, R., Fowler, S., Lyskowski, D., Piyasena, H., Carleton, K., Spicer, C., Ye, Z.-H. (2010).** The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 51, 1084–1090.
83. **McDowell, N. G., Williams, A. P., Xu, C., Pockman, W. T., Dickman, L. T., Sevanto, S., ... & Koven, C. (2016).** Multi-scale predictions of massive conifer mortality due to chronic temperature rise. *Nature Climate Change*, 6(3), 295-300.
84. **McFarlane, H.E., Döring, A., Persson, S. (2014).** The cell biology of cellulose synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 69–94.
85. **Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J. Y., Helariutta, Y. (2013).** Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO Journal*, 32(2), 178–193. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.301>
86. **Moshchenskaya, Y. L., Galibina, N. A., Nikerova, K. M., Tarelkina, T. V., Korzhenevsky, M. A., Sofronova, I. N., ... & Semenova, L. I. (2022).** Plant-Programmed Cell Death-Associated Genes Participation in *Pinus sylvestris* L. Trunk Tissue Formation. *Plants*, 11(24), 3438.
87. **Neale, D. B., & Wheeler, N. C. (2019).** Gene and genome sequencing in conifers: Modern era. *The Conifers: Genomes, Variation and Evolution*, 43-60.
88. **Nguyen, T. T. T., Bae, E. K., Tran, T. N. A., Lee, H., & Ko, J. H. (2023).** Exploring the Seasonal Dynamics and Molecular Mechanism of Wood Formation in Gymnosperm Trees. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8624.
89. **Palle, S.R., Seeve, C.M., Eckert, A.J., Cumbie, W.P., Goldfarb, B., Loopstra, C.A. (2011).** Natural variation in expression of genes involved in xylem development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes* 7: 193–206.
90. **Paredez, A. R., Somerville Ch. R., Ehrhardt D.W. (2006).** Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science*, 312(5779), 1491–1495. doi:10.1126/science.1126551

91. **Pascual, M. B., El-Azaz, J., de la Torre, F. N., Cañas, R. A., Avila, C., & Cánovas, F. M. (2016).** Biosynthesis and metabolic fate of phenylalanine in conifers. *Frontiers in plant science*, 7, 1030.
92. **Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004).** Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in plant science*, 9(11), 534-540.
93. **Pastori, G. M., & del Río, L. A. (1997).** Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes). *Plant Physiology*, 113(2), 411-418.
94. **Pawlowska, A., Treder, K. (2014).** Peroksydazy-male enzymy o wielkim znaczeniu. *Ziemiak Polski*, 24(1).
95. **Pearson, M., Saarinen, M., Nummelin, L., Heiskanen, J., Roitto, M., Sarjala, T., Laine, J. (2013).** Tolerance of peat-grown Scots pine seedlings to waterlogging and drought: Morphological, physiological, and metabolic responses to stress. *Forest Ecology and Management*, 307, 43–53.
96. **Pedreira, J., Sanz, N., Peña, M. J., Sánchez, M., Queijeiro, E., Revilla, G., Zarra, I. (2004).** Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 530-534.
97. **Pennell, R. I., & Lamb, C. (1997).** Programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, 9(7), 1157.
98. **Perdiguero, P., Soto, Á., & Collada, C. (2015).** Comparative analysis of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* dehydrins under drought stress. *Tree Genetics & Genomes*, 11(4). doi:10.1007/s11295-015-0899-1
99. **Pickett-Heaps, J. D. (1967).** The effects of colchicine on the ultrastructure of dividing plant cells, xylem wall differentiation and distribution of cytoplasmic microtubules. *Developmental Biology*, 15(3), 206–236
100. **Pińkowska, H., Złocińska, A. (2014)** Pektyny–występowanie, budowa chemiczna i właściwości. *Wiadomości chemiczne* (68, 7-8), 683-700.
101. **Pizarro, A., & Díaz-Sala, C. (2020).** Effect of polar auxin transport and gibberellins on xylem formation in pine cuttings under adventitious rooting conditions. *Israel Journal of Plant Sciences*, 67(1-2), 27-39.
102. **Plomion, C., Pionneau, C., Brach, J., Costa, P., Baillères, H. (2000).** Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plant Physiology*, 123, 959–969.

103. **Pukacki, P. M., Kamińska-Rożek, E. (2002).** Long-term implications of industrial pollution stress on lipids composition in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24, 249-255.
104. **Putoczki, T. L., Gerrard, J. A., Butterfield, B. G., & Jackson, S. L. (2008).** The distribution of un-esterified and methyl-esterified pectic polysaccharides in *Pinus radiata*. *IAWA journal*, 29(2), 115-127.
105. **Rabara, R. C., Tripathi, P., Reese, R. N., Rushton, D. L., Alexander, D., Timko, M. P., ... Rushton, P. J. (2015).** Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement. *BMC genomics*, 16, 1-23.
106. **Quaderi, M.M., Martel, A.B., Dixon, S.L. (2019).** Environmental Factors Influence Plant Vascular System and Water Regulation. *Plants* 8 (3), 65.
107. **Qin, S., Fan, C., Li, X., Li, Y., Hu, J., Li, C., & Luo, K. (2020).** LACCASE14 is required for the deposition of guaiacyl lignin and affects cell wall digestibility in poplar. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-14.
108. **Roitto, M., Markkola, A., Julkunen-Tiitto, R., Sarjala, T., Rautio, P., Kuikka, K., Tuomi, J. (2003).** Defoliation-induced responses in peroxidases, phenolics, and polyamines in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Journal of chemical ecology*, 29(8), 1905-1918.
109. **Samuels, A., Rensing, K., Douglas, C., Mansfield, S., Dharmawardhana, D., Ellis, B. (2002).** Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta*, 216(1), 72-82.
110. **Sánchez, M., Revilla G., Zarra I. (1995).** Changes in Peroxidase Activity Associated with Cell Walls During Pine Hypocotyl Growth. *Annals of Botany*, 75(4), 415–419. doi:10.1006/anbo.1995.1039
111. **Sandberg, G., Ernstsén, A., & Hamnede, M. (1987).** Dynamics of indole-3-acetic acid and indole-3-ethanol during development and germination of *Pinus sylvestris* seeds. *Physiologia Plantarum*, 71(4), 411-418.
112. **Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J., Berleth, T. (2006).** Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & Development*, 20(8), 1015–1027.
113. **Schopfer, P. (1994).** Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiology*, 104(4), 1269-1275.

114. **Sudachkova, N. E., Romanova, L. I., Astrakhantseva, N. V., Novoselova, M. V., Kosov, I. V. (2016).** Stress reactions of Scots pine trees to injuring by ground fire. *Contemporary problems of ecology*, 9(5), 608-616.
115. **Sun, S., Chen, H., Yang, Z., Lu, J., Wu, D., Luo, Q., ... & Tan, J. (2022).** Identification of WRKY transcription factor family genes in *Pinus massoniana* Lamb. and their expression patterns and functions in response to drought stress. *BMC Plant Biology*, 22(1), 424.
116. **Sundell, D., Street, N.R., Kumar, M., Mellerowicz, E.J., Kucukoglu, M., Johnsson, C., Kumar, V., Mannapperuma, C., Delhomme, N., Nilsson, O., Tuominen, H., Pesquet, E., Fischer, U., Nüttlä, T., Sundberg, B., Hvidsten, T.R. (2017).** AspWood: High-Spatial-Resolution Transcriptome Profiles Reveal Uncharacterized Modularity of Wood Formation in *Populus tremula*. *The Plant Cell*, Vol. 29: 1585–1604.
117. **Swidrak, I., Gruber, A., & Oberhuber, W. (2014).** Xylem and phloem phenology in co-occurring conifers exposed to drought. *Trees*, 28, 1161-1171.
118. **Tardieu, F., Simonneau, T., Muller, B. (2018).** The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annual review of plant biology*, 69(1), 733-759.
119. **Turner, S, Kumar, M. (2018).** Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. *Phil. Trans. R. Soc. A* 376: 20170048. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2017.0048>
120. **Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G., & Sundberg, B. (1996).** Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9282–9286. doi:10.1073/pnas.93.17.9282
121. **Ursache, R., Miyashima, S., Chen, Q., Vatén, A., Nakajima, K., Carlsbecker, A., Zhao, Y., Helariutta, Y., Dettmer, J. (2014).** Tryptophan-dependent auxin biosynthesis is required for HD-ZIP III-mediated xylem patterning. *Development*, 141(6), 1250–1259. <https://doi.org/10.1242/dev.103705>
122. **Vieira, J., Rossi, S., Campelo, F., Freitas, H., & Nabais, C. (2013).** Xylogenesis of *Pinus pinaster* under a Mediterranean climate. *Annals of Forest Science*, 71(1),
123. **Wagner, A., Tobimatsu, Y., Phillips, L., Flint, H., Geddes, B., Lu, F., Ralph, J. (2015).** Syringyl lignin production in conifers: Proof of concept in a Pine tracheary element system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6218–6223.

124. **Wang, J. P., Matthews, M. L., Williams, C. M., Shi, R., Yang, C., Tunlaya-Anukit, S., ... & Chiang, V. L. (2018).** Improving wood properties for wood utilization through multi-omics integration in lignin biosynthesis. *Nature communications*, 9(1), 1-16.
125. **Wang, Q., Ci, D., Li, T., Li, P., Song, Y., Chen, J., Quan, M., Zhou, D., Zhang, D. (2016).** The Role of DNA Methylation in Xylogenesis in Different Tissues of Poplar. *Front.PlantSci.*7:1003.
126. **Wang, Q., Little, C. H. A., & Odén, P. C. (1997).** Control of longitudinal and cambial growth by gibberellins and indole-3-acetic acid in current-year shoots of *Pinus sylvestris*. *Tree physiology*, 17(11), 715-721.
127. **Wang, H., Shao, W., Yan, M., Xu, Y., Liu, S., Wang, R. (2021).** Genome-wide analysis and expression profiling of HD-ZIP III genes in three *Brassica* species. *Diversity*, 13(12), 684.
128. **Wang, X., Yao, S., Htet, W. P. P. M., Yue, Y., Zhang, Z., Sun, K., ... & Fan, D. (2022).** MicroRNA828 negatively regulates lignin biosynthesis in stem of *Populus tomentosa* through MYB targets. *Tree Physiology*.
129. **Wang, X., Mäkilä, R., Mähönen, A. P. (2023).** From procambium patterning to cambium activation and maintenance in the *Arabidopsis* root. *Current Opinion in Plant Biology*, 75, 102404.
130. **Wang, Y., Yuan, Z., Wang, J., Luo, Y., Xu, K., Wei, W. et al. (2019).** Genome-wide analysis of PIN genes in maize and their expression under stress. *Genes*, 10(10), 792.
131. **Whetten, R., Sederoff, R. (1995).** Lignin biosynthesis. *The plant cell*, 7(7), 1001.
132. **Wojciechowski, W., Kesy, J., Kopcewicz, J. (2013).** Mechanizmy powstawania drewna u drzew leśnych. *Zarządzanie Ochroną Przyrody w Lasach* 7: 205-232.
133. **Wu, C., Lin, Y., Lu, Y., Wu, J. (2021).** Genome-wide identification and expression analysis of the PIN gene family in *Liriodendron chinense* under abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 167, 696–705.
134. **Yang, S.-H., van Zyl, L., No, E.-G., Loopstra, C. A. (2004).** Microarray analysis of genes preferentially expressed in differentiating xylem of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Science*, 166(5), 1185–1195. doi:10.1016/j.plantsci.2003.12.030
135. **Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., Chen, S. (2021).** Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
136. **Zhang, B., Deng, L., Qian, Q., Xiong, G., Zeng, D., Li, R., Guo, L., Li, J., Zhou, Y. (2009).** A missense mutation in the transmembrane domain of CESA4 affects protein

- abundance in the plasma membrane and results in abnormal cell wall biosynthesis in rice. *Plant Molecular Biology* volume 71, Article number: 509 (2009)
137. **Zhang, L., Liu, B., Zhang, J., Hu, J. (2020).** Insights of Molecular Mechanism of Xylem Development in Five Black Poplar Cultivars. *Frontiers in Plant Science* 11:620.
 138. **Zhang, Y., Luan, Q., Jiang, J., Li, Y. (2021).** Prediction and utilization of malondialdehyde in exotic pine under drought stress using near-infrared spectroscopy. *Frontiers in plant science*, 12, 735275.
 139. **Zhang, Y., Sederoff, R.R., Allona, I. (2000).** Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. *Tree Physiology* 20: 457–466.
 140. **Zhang J, Wang D, Chen P, Zhang C, Yao S, Hao Q, Agassin RH, Ji K. 2023** The Transcriptomic Analysis of the Response of *Pinus massoniana* to Drought Stress and a Functional Study on the ERF1 Transcription Factor. *International Journal of Molecular Sciences.*; 24(13):11103. <https://doi.org/10.3390/ijms241311103>
 141. **Zhao, Yj., Cao, Y., Wang, J. et al. 2018** Transcriptome sequencing of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* and comparative analysis in the *Pinus* phylogeny. *BMC Genomics* **19**, 725. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5127-6>
 142. **Zhong, R., McCarthy, R. L., Haghighat, M., Ye, Z.-H. (2013).** The Poplar MYB Master Switches Bind to the SMRE Site and Activate the Secondary Wall Biosynthetic Program during Wood Formation. *PLoS ONE*, 8(7), e69219. doi:10.1371/journal.pone.0069219
 143. **Zhong, R., Morrison, W. H. III, Himmelsbach, D. S., Poole, F. L. II, & Ye, Z.-H. (2000).** Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiology*, 124(2), 563–578.
 144. **Zhu, Y., Song, D., Xu, P., Sun, J., & Li, L. (2018).** A *HD-ZIP III* gene, *PtrHB4*, is required for interfascicular cambium development in *Populus*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(3), 808-817.

SPIS ILUSTRACJI

- Ryc. 1 Uproszczony schemat obrazujący kompleks enzymatyczny syntazy celulozy zlokalizowany w błonie komórkowej.
- Ryc. 2 Szlaki biosyntezy monomerów ligniny.
- Ryc. 3 Typy strategii przetrwania roślin w warunkach stresu. Opracowanie własne.
- Ryc. 4 Cykl glutationowo-askorbinianowy u roślin
- Ryc. 5 Nasiona sosny zwyczajnej przed wysianiem
- Ryc. 6 Hodowla siewek na krążkach torfowych
- Ryc. 7 Materiał zebrany do analizy zmian świeżej i suchej masy pod wpływem odwodnienia
- Ryc. 8 Homogenizacja prób w moździerzach
- Ryc. 9 Próby przed wirowaniem i po dodaniu roztworu TBA
- Ryc. 10 Próby w szklanych probówkach podczas inkubacji z roztworem TBA oraz spektrofotometryczny pomiar absorbancji.
- Ryc. 11. Pomiar poziomu anionorodnika nadadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ w reakcji z NBT - przygotowywanie doświadczenia – roztwór inkubacyjny, bufor, próbki i materiał roślinny.
- Ryc. 12 – 22 Fotografie obrazujące zmiany w budowie morfologicznej siewek sosny pod wpływem stresu odwodnienia (dzień 0-8)
- Ryc. 23 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 5x).
- Ryc. 24 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 5x).
- Ryc. 25 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 20x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.
- Ryc. 26 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 20x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.
- Ryc. 27 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 40x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.

- Ryc. 28 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 40x). Preparat barwiony błękitem toluidynowym.
- Ryc. 29 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 5x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 30 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 5x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 31 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 20x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 32 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 20x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 33 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, kontrola, pow. 40x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 34 Przekrój poprzeczny przez epikotyl siewki *Pinus sylvestris* (30 dni od wykiełkowania, 7 dzień stosowania warunków stresowych, pow. 40x). Preparat barwiony floroglucyną.
- Ryc. 35 Poziom RWC [%] w epikotylach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu
- Ryc. 36 Poziom RWC [%] w hipokotylach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu
- Ryc. 37 Poziom RWC [%] w korzeniach siewek sosny w dniach 0-8 stosowania stresu
- Ryc. 38. Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBA) mierzony w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K).
- Ryc. 39. Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBA) mierzony łącznie w hipokotylach i korzeniach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K).
- Ryc. 40. Poziom anionorodnika ponadtlenkowego mierzony w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – absorbancja w przeliczeniu na gram świeżej masy.

- Ryc. 41. Poziom anionorodnika ponadtlenkowego mierzony łącznie w korzeniach i hipokotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Oś pionowa – absorbancja w przeliczeniu na gram świeżej masy.
- Ryc. 42. Poziom nadtlenu wodoru mierzony w epikotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Na osi pionowej – stężenie H_2O_2 [$\mu\text{M/g}$ świeżej masy].
- Ryc. 43. Poziom nadtlenu wodoru mierzony łącznie w korzeniach i hipokotylach siewek sosny traktowanych stresem suszy (S) oraz siewek kontrolnych (K). Na osi pionowej – stężenie H_2O_2 [$\mu\text{M/g}$ świeżej masy].
- Ryc. 44. Względna zmiana ekspresji genu *DHNI* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).
- Ryc. 45. Względna zmiana ekspresji genu *COMT* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).
- Ryc. 46. Względna zmiana ekspresji genu *PINI* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).
- Ryc. 47. Względna zmiana ekspresji genu *HDZ33* w czasie trwania doświadczenia, obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ błąd standardowy ($n = 3$).

SPIS TABEL

Tab. 1	Schemat doświadczenia.
Tab. 2	Program NOC HistoCore PEARL do obróbki tkanek (zmodyfikowany).
Tab. 3	Krzywa standardowa dla nadtlenu wodoru.
Tab. 4	Sekwencje starterów z bazy danych NCBI dla wybranych genów.