

Waldemar Wojciechowski¹, Jacek Kęsy¹, Jan Kopcewicz^{1,2}

¹ Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

² Wyższa Szkoła Zarządzania Środowiskiem w Tucholi

MECHANIZMY POWSTAWANIA DREWNA U DRZEW LEŚNYCH

MECHANISMS OF WOOD FORMATION IN FOREST TREES

Słowa kluczowe: drewno wtórne, molekularne mechanizmy ksylogenezy, hormony i geny w ksylogenezie, drzewa leśne

Key words: secondary xylem, molecular mechanism of xylogenesis, hormones and genes in xylogenesis, forest trees

Abstract. Xylogenesis is a very complicated process of cell differentiation which contains: a formation of active cambium (1), a proliferation of specialized cells (2), their transformation to xylem initial cells (3) a formation of secondary walls (SCW) and final apoptosis (PCD – programmed cell death) of xylem cells (4). In the secondary xylem, namely, the wood, the conducting elements are the tracheary cells. Their function is a long-distance water transport, as nonliving cells after autolysis of their protoplast. The tracheary cells are characterized by secondary walls which enable them to retain their shape when dead, despite the pressure of the surrounding cells. The two fundamental types of xylem conduits are: the tracheid (typical for gymnosperms) and the vessel (of angiosperms) which is built of vessel elements. Among the vessels there are the specialized supporting cells, the fibres. In the radial direction, the wood contains the vascular rays which are usually built of parenchymal cells. The secondary xylem in trees is induced and controlled by streams of inductive hormonal signals which shape wood quality and quantity. Plant hormones are organic molecules that at low concentrations influence plant growth and development. The hormones are synthesized in various locations, move through specific transport pathways to sites where they regulate growth and differentiation. The hormonal signals (auxins, cytokinins, gibberellins, brassinosteroids, ethylene) that induce the wood move in vascular tissues and regulate multiple organized process of xylem cells differentiation. Auxin is the primary hormonal signal which control wood formation; it is mainly produced in young leaves moves downward through the cambium and induced the wood. Cytokinins, from root tips moves upwards, increases the sensitivity of the cambium to the auxin signal and stimulates cambial cell divisions. Gibberellins promote shoot elongation and induces long fibres and tracheids. Also brassinosteroids and ethylene participate in the secondary xylem differentiation. The hormonal control of wood formation is mediated by the expression of specific genes and numerous transcription factors which regulate various aspects of cell differentiation and secondary xylem production. This paper summarizes the current knowledge on participation of phytohormones as well as various groups of genes and transcription factors in mechanism of wood formation in forest trees and herbaceous model plant. Obviously, further and more detailed analyses are required, although it can already be stated that the foundations of the mechanisms for the formation of the wood are evolutionarily conserved and are similar across different plant species.

WSTĘP

Drzewa stanowią szczególną grupę roślin we florze naszego globu ze względu na to, że są największymi i najstarszymi organizmami roślinnymi żyjącymi na Ziemi. Część nadziemna drzewa jest zróżnicowana na pień, czyli wznoszącą się ku górze oś główną, oraz koronę powstającą na skutek rozgałęziania się pnia. Część podziemna to silnie rozwinięty korzeń, którego łączna masa dorównuje, a czasem nawet przewyższa, masę części nadziemnej.

Drzewa pełnią różne funkcje. Są źródłem surowca dla gospodarki leśnej, ważnym elementem krajobrazu oraz obiektem badań i zabiegów dendrologa i leśnika.

Drzewa odgrywają także podstawową rolę w zespołach leśnych, tworząc warstwę drzew, czyli drzewostan. Drzewostan wywiera wpływ na ukształtowanie całości zespołu leśnego poprzez zmiany jakie wywołuje w układzie warunków ekologicznych. W ten sposób determinuje możliwość występowania w lesie pozostałych warstw roślinności (podszyt, runo leśne) i ich rytmikę sezonową.

Każde drzewo posiada określoną strukturę, która wyraża się w wielopoziomowym układzie. Z jednej strony istnieją różne poziomy wewnętrznej organizacji (molekuły, komórki, tkanki), zaś z drugiej strony struktura zewnętrzna, której elementami są poszczególne organy o określonym kształcie i rozmieszczeniu w przestrzeni (korzeń, pień, korona). Budowa drzewa zmienia się w trakcie rozwoju osobniczego. Zmieniają się rozmiary, proporcje między organami, powstają ciągle nowe organy (nowe pędy, gałęzie, organy generatywne). Zmienia się zatem zarówno struktura wewnętrzna jak i struktura zewnętrzna drzewa. Następuje ciągły jego rozwój, który jest wynikiem współzależności między strukturą i funkcją. Korzeń rośnie w dół w poszukiwaniu wody i związków mineralnych gleby, pęd rośnie ku górze w poszukiwaniu światła niezbędnego do fotosyntezy (odżywianie) i fotomorfogenezy (różnicowanie).

Pień jest organem pośrednim łączącym korzenie i koronę. Utrzymuje olbrzymi ciężar korony. Służy temu wewnętrzna budowa pnia. Znajdują się tam wiązki przewodzące, tkanki mechaniczne oraz w obwodowych częściach korowina. W pniach drzew silnie rozbudowane jest drewno wtórne, a w nim komórki sklerenchymatyczne włókien drzewnych.

We wzorcu rozwojowym drzew wyróżnić można trzy główne szlaki rozwojowe: 1. od zarodka, 2. od wierzchołka, 3. od kambium [Kopcewicz, 2012]. Szlak rozwojowy „od zarodka” obejmuje całość rozwoju ontogenetycznego, rozpoczyna się zygotą i kończy naturalną śmiercią organizmu. Szlak rozwojowy „od wierzchołka” jest związany z działalnością merystemów wierzchołkowych pędów i korzeni. Powoduje to, że poszczególne pędy i korzenie drzewa mają podwójny wiek: całej rośliny (np. 100 lat) i swój własny (np. 2 lata). Szlak rozwojowy „od kambium” jest związany natomiast z działalnością tkanki twórczej

kambium, która dzieląc się tworzy ciągle nowe warstwy drewna (ku środkowi) i łyka (na zewnątrz). Powoduje to rozrastanie się pnia a także wszystkich łądyg i korzeni na grubość.

Występowanie u drzew różnych szlaków rozwojowych jest wyrazem ich przystosowania do życia w różnych warunkach środowiskowych. Nie mając zdolności lokomotorycznych, drzewa podejmują „walkę” o swoje przeżycie w warunkach ekstremalnych. Reakcją rośliny jest uaktywnienie, względnie zahamowanie aktywności merystemów. Drzewo reaguje na niepomyślne czynniki środowiskowe przyspieszeniem procesów rozwojowych (szybki wzrost, ruchy organów), bądź ich zahamowaniem (okresy spoczynku). Reagowanie drzewa na niepomyślne czynniki zewnętrzne określoną aktywnością merystemów jest więc ewolucyjnie wytworzoną zdolnością adaptacyjną.

Rośliny naczyniowe pojawiły się na przełomie syluru i dewonu około 400 mln lat temu. Były to rośliny małe i dopiero później w procesie ewolucji kambium powstały prawdziwe formy drzewopodobne. Kambium waskularne pojawiło się prawdopodobnie około 350 mln lat temu, jednakże już w karbonie, około 300 mln lat temu, niektóre widłaki (*Lepidodendron*, *Sigillaria*) osiągały wysokość około 40 metrów. Tak więc wykształcenie się i rozwój kambium oraz pojawienie się zdolności syntetyzowania ligniny miały decydujące znaczenie dla powstania form drzewiastych roślin. Powstanie przyrostu wtórnego u drzew wiązało się również z ważnym zjawiskiem, iż drewno wtórne zaczęło pełnić funkcję zarówno tkanki przewodzącej jak i mechanicznej. Kambium powodujące powstawanie łyka i drewna wraz z felogenem inicjującym tworzenie się perydermy i korowiny dały podstawę do wytworzenia się właściwej struktury i funkcjonowania drzew. Przyrost wtórny u drzew powoduje również na dużą skalę wiązanie i magazynowanie w postaci polisacharydów dwutlenku węgla. Powstające w procesie ksylogenezy drewno jest w końcu niezastąpionym surowcem służącym człowiekowi do zaspokajania wielorakich potrzeb. Zatem mechanizmy tworzenia się drewna znajdują się w centrum zainteresowania zarówno z teoretycznego jak i praktycznego punktu widzenia.

DREWNO WTÓRNE U ROŚLIN DRZEWIASTYCH

Po wykształceniu się budowy pierwotnej pędu, w łądygach rozpoczyna się przyrost wtórny na grubość. Zachodzi on dzięki działalności dwóch wtórnych merystemów bocznych tzn. kambium i felogenu. Przyrost wtórny łądyg rozpoczyna się z chwilą przekształcenia prokambium w aktywne kambium oraz odróżnicowania felogenu tworzącego wtórną tkankę okrywającą tzn. perydermę.

Istnieją dwa rodzaje kambium: wiązkowe i międzywiązkowe. **Kambium wiązkowe** powstaje z pasm niezróżnicowanego prokambium znajdujących się

między drewnem i łykiem pierwotnym, natomiast **kambium międzywiązkowe** powstaje przez odróżnicowanie komórek miękiszowych promieni rdzeniowych. Kambium wiązkowe i międzywiązkowe łączą się ze sobą tworząc ciągły system tkanki merystematycznej. Komórki kambium dzielą się peryklinalnie. Wyróżnić można wśród nich wrzecionowate komórki inicjalne elementów przewodzących (drewna i łyka) oraz izodiametryczne komórki inicjalne promieni rdzeniowych [Tomanek i Witkowska-Żuk, 2008].

W wyniku działania **kambium wrzecionowatego** na zewnątrz odkładana jest mniejsza ilość łyka wtórnego, a do środka znacznie większa ilość drewna wtórnego. Łyko u drzew iglastych stanowią komórki sitowe i miękisz łykowy. U drzew liściastych powstają rury sitowe, komórki przyrurkowe, miękisz łykowy i włókna łykowe. Elementami drewna u drzew szpilkowych są cewki i miękisz drzewny, u drzew liściastych drewno stanowią naczynia, cewki, miękisz drzewny i włókna drzewne.

Tworzenie się drewna (proces **ksylogenezy**) podzielone jest na cztery etapy. W etapie pierwszym powstaje aktywne kambium, drugi obejmuje inicjację komórek przez nie wytworzonych, trzeci przekształcenie się ich w komórki prekursorowe drewna a ostatni to formowanie się grubych wtórnych ścian komórkowych i apoptoza (PCD – programowana śmierć komórki). W ten sposób powstają naczynia, cewki i włókna drzewne [Hejnowicz, 2002].

Kambium izodiametryczne inicjuje powstawanie promieni rdzeniowych poprzez podziały w kierunku promieniowym oraz skośnym. Prowadzi to do rozrastania się pierścienia kambium i przeciwdziała jego rozerwaniu na skutek odkładania większej ilości drewna do wnętrza.

Kambium w czasie przyrostu wtórnego stale zachowuje pozycję między drewnem a łykiem wtórnym i odkłada ciągle nowe elementy drewna do środka i elementy łyka na zewnątrz. Powoduje to, że drewno i łyko pierwotne są rozdzielane przez ciągle nowo powstające elementy drewna i łyka wtórnego. Łodyga powiększa zatem swoją średnicę a więc następuje jej przyrost wtórny na grubość.

Długoletnia żywotność kambium jest cechą charakterystyczną wszystkich roślin drzewiastych nagonasiennych oraz okrytonasiennych dwuliściennych, dzięki czemu przyrastają one na grubość i dochodzą do potężnych rozmiarów. Kambium występuje w pniu oraz we wszystkich korzeniach i gałęziach drzewa, z wyjątkiem ich najmłodszych części gdzie funkcjonuje prokambium. Na całej swej powierzchni kambium wytwarza drewno i łyko w ciągu całego życia drzewa.

W naszej strefie klimatycznej następstwo pór roku wpływa na działalność merystemów u drzew. Aktywność kambium zaczyna się na wiosnę, najpierw w pędach i gałęziach, skąd przesuwa się w kierunku podstawy pnia.

Pień stanowi główną oś drzewa. Spełnia zarówno funkcje fizjologiczne jak i mechaniczne. Przewodzi wodę i sole mineralne z korzenia do korony oraz na pniu

osadzone są wszystkie organy części nadziemnej drzewa. Nadziemną i podziemną część drzewa okrywa kora w której wyróżnić można dwie warstwy: 1. zewnętrzną, martwą, którą stanowi korek (felem) wytworzony przez felogen, oraz 2. wewnętrzną, żywą, którą stanowi feloderma wytworzona przez felogen oraz lyko wytworzone przez kambium. Kora, podobnie jak drewno, przyrasta co roku na grubość.

Główną część pnia stanowi drewno, zajmujące przestrzeń między rdzeniem a kambium. Drewno stanowi największą część objętości pnia i ono decyduje o jego właściwościach mechanicznych. W skład drewna wchodzi trzy zasadnicze rodzaje tkanek: 1. przewodzące – naczynia i cewki, 2. spichrzowe – miękisz drzewny i miękisz promieni drzewnych, 3. wzmacniające – cewki, cewki włókniste, włókna drzewne [Tomanek i Witkowska-Żuk, 2008].

Każda warstwa drewna wytworzona w ciągu okresu wegetacyjnego stanowi **słój roczny**. U drzew umiarkowanej strefy klimatycznej następstwo pór roku wpływa na działalność merystemów. Wznowieniu aktywności pąków towarzyszy uruchomienie aktywności kambium. Jednak u niektórych drzew tropikalnych kambium utrzymuje aktywność przez cały rok wykazując okresy podwyższonej aktywności w czasie szybkiego rozwoju pąków i pędów. W naszej strefie klimatycznej merystemy rozpoczynają działalność wczesną wiosną (marzec), a kończą w połowie lata (sierpień). Różnice w aktywności kambium prowadzą do powstania elementów drewna o różnej wielkości [Aloni, 1991]. Wiosną tworzone **drewno wczesne** posiada dużą średnicę naczyń, cewek i cieńsze ściany, a jamki lejkowate występują na ścianach promienistych. Pełni ono głównie funkcję przewodzącą. **Drewno późne**, tworzone w sierpniu, posiada naczynia i cewki mniejsze o grubych ścianach komórkowych. Drewno to pełni głównie funkcję wzmacniającą. Różnice między drewnem wiosennym i letnim są bardzo wyraźne u drzew szpilkowych oraz niektórych drzew liściastych (np. dąb, wiąz, jesion).

Tak więc, warstwa drewna wytworzona w ciągu okresu wegetacyjnego stanowi słój roczny w granicach którego wyróżnić można dwa obszary: drewna wiosennego (wczesnego) i letniego (późnego). Liczba słoików rocznych w pewnym obszarze pnia lub gałęzi jest wskaźnikiem wieku tej części organu, a ich szerokość jest miarą rocznego przyrostu pędu na grubość. W pewnych warunkach jednak słoje roczne mogą w ogóle nie powstawać (niekorzystne warunki), bądź podwajać się (gdy drzewo wytworzy parokrotnie ulistnienie). Liczba słoików rocznych pnia czy pędu jest tym mniejsza, im dany przekrój jest bliższy wierzchołkowi wzrostu. Organy leżące bliżej wierzchołka wzrostu są po prostu młodsze, a zatem cieńsze.

Szerokość słoików rocznych, a więc przyrost roczny pnia lub gałęzi na grubość zależy od gatunku i wieku drzewa oraz od warunków środowiska. Różne czynniki środowiskowe mogą powodować zmiany kształtu przekroju poprzecznego pnia i gałęzi drzewa. Powstaje często strefa wzmożonego przyrostu z rozszerzonym słoikiem rocznym. Rezultatem jest wytworzenie tzw. **drewna reakcyjnego**

[Tomanek i Witkowska-Żuk, 2008]. Drewno reakcyjne drzew iglastych, zwane **drewnem kompresyjnym** tworzy się na dolnej stronie gałęzi i pochylonych pni i charakteryzuje się grubościennymi cewkami o ścianach silnie zdrewniałych. U drzew liściastych drewno reakcyjne, zwane **drewnem tensyjnym**, tworzy się na górnej stronie gałęzi i pochylonych pni i charakteryzuje się wielką ilością włókien drzewnych. Tworzenie drewna reakcyjnego pomaga korygowaniu położenia pnia względem osi działania siły ciężkości oraz ułożenia rozgałęzień korony drzewa.

Drewno drzew iglastych składa się głównie z cewek (około 90%) które spełniają zarówno funkcje przewodzące, jak i mechaniczne. Oprócz cewek znajdują się w drewnie jeszcze miękisz promieni, miękisz wydzielniczy przewodów żywicznych oraz w ograniczonych ilościach miękisz drzewny. Granica między drewnem wczesnym a późnym jest ostro zaznaczona, a w drewnie występują przewody żywiczne [Kopcewicz i in., 2012].

Drewno drzew liściastych składa się z włókien drzewnych i cewek włóknistych (około 50%), naczyń, cewek, promieni drzewnych i miękiszu drzewnego. Brak przewodów żywicznych. Biorąc pod uwagę rozmieszczenie, wielkość i rozkład naczyń w drewnie wczesnym i późnym można wyróżnić trzy grupy drzew liściastych [Tomanek i Witkowska-Żuk, 2008]. Grupa pierwsza to drzewa o drewnie **pierścieniowonaczyniowym**. W drewnie tym duże naczynia drzewna wczesnego układają się w jedno- lub wielowarstwowy pierścień wyraźnie oddzielony od małych naczyń drzewna późnego. Te ostatnie układają się promieniowo (np. dąb), stycznie falisto (np. wiąz) bądź pojedynczo rozrzucone (np. jesion).

Grupa druga to drzewa z **drewnem rozpierzchłonaczyniowym**. Naczynia zarówno drzewna wczesnego jak i późnego są podobnej wielkości i rozmieszczone są dość równomiernie na całej przestrzeni słoja rocznego (np. buk, brzoza, klon, olsza, topola, wierzba).

Trzecią grupę stanowią drzewa o **drewnie półpierścieniowonaczyniowym**. Wielkość naczyń w słoju rocznym nieznacznie się zmniejsza (np. orzech), bądź w drewnie wczesnym występuje określona ilość naczyń o większej średnicy (np. wiśnia).

Oprócz naczyń i cewek (naczyniowych i włóknistych) w drewnie drzew iglastych i liściastych występują jeszcze włókna drzewne, miękisz drzewny i promienie drzewne [Hejnowicz, 2002]. **Włókna drzewne** są to wydłużone, grubościennie komórki, przeważnie martwe, wypełnione wodą lub powietrzem. U drzew liściastych stanowią główną część masy drewna i decydują o właściwościach mechanicznych poszczególnych rodzajów drewna. **Miękisz drzewny** to żywe, cienkościennie komórki gromadzące skrobię jako materiał zapasowy. Komórki te mogą być rozproszone wśród tkanki drzewna (miękisz dyfuzyjny) lub zgrupowane przy granicy słoików (miękisz terminalny). **Promienie drzewne** (rdzeniowe) składają się z komórek miękiszowych. Promienie te są zazwyczaj wielorzędowe i to zarówno jednorodne (komórki jednakowego kształtu),

jak i niejednorodne składające się ze środkowych komórek leżących i brzeżnych stojących.

Z upływem czasu w budowie drewna zachodzą zmiany. Zazwyczaj tylko najmłodsze, zewnętrzne partie drewna zachowują funkcje przewodzące i spichrzowe [Hejnowicz, 2002]. To drewno nazywa się **bielem** albo drewnem miękkim. Grubość bielu jest mniej więcej stała w obrębie gatunku, jednak pomiędzy gatunkami i rodzajami mogą występować znaczące różnice. Naczynia i cewki położone w starszych (głębszych) partiach (słojach) drewna tracą z czasem zdolność przewodzenia wody. Komórki miękiszu drzewnego i promienie rdzeniowe drewnieją a następnie zamierają. W ten sposób powstaje tzw. **twardziel**, czyli drewno twarde, które stanowi już wyłącznie element wzmacniający pień. Twardziel różni się zwykle od jasnego bielu ciemniejszą barwą powstałą na skutek odkładania się w niej substancji konserwujących i impregnujących jak gумы, garbniki, żywice, lignina, olejki eteryczne. Starzenie się drewna wtórnego, postępujące z wiekiem drzewa, nosi nazwę twardzielowania. Drewno staje się twardsze, cięższe i bardziej odporne na działanie różnych czynników niszczących, przede wszystkim grzybów powodujących rozkład drewna. Drewno takie charakteryzuje się większą twardością i trwałością. Twardzielowanie powoduje zatem, że drewno staje się tkanką wyłącznie mechaniczną, usztywniającą pień drzewa. Jednakże twardzielowanie prowadzi także do ogólnego zmniejszenia sprawności przewodzenia wody i soli mineralnych, co w konsekwencji staje się istotną przyczyną starzenia się drzewa. Proces wytwarzania twardzieli u większości gatunków drzew, w zależności od klimatu, położenia i siedliska, następuje między 20 a 40 rokiem życia.

Nie u wszystkich drzew drewno różnicuje się na wyraźną biel i twardziel. Drzewa twardzielowe to dęby, sosny, modrzewie, cisy, chojny, jałowce, buki, lipy, jodły i świerki. Natomiast drzewa bielaste (bez wyraźnej twardzieli) to brzozy, graby, klony, olchy, topole i wierzby.

W środku pnia znajduje się rdzeń. Na przekroju poprzecznym pnia jest to strefa ciemnej zabarwiona niż otaczające go drewno najwcześniej utworzonego słoja. W młodym pędzie rdzeń tworzą żywe komórki miękiszowe wypełnione obficie substancjami zapasowymi. Z biegiem czasu komórki te obumierają i wypełniają się powietrzem, żywicą i innymi substancjami impregnującymi. Stopniowe obumieranie rdzenia jest skorelowane w czasie z wykształcaniem się twardzieli [Kopcewicz i in., 2012]. Z chwilą bowiem kiedy wewnętrzne warstwy drewna tworząc twardziel ulegają zaczopowaniu i impregnacji ligniną, podobnym przemianom ulegają również komórki rdzenia. Kształt rdzenia bywa różnorodny, często okrągły lub owalny, jednak np. u olszy – trójkątny, u jesionu – czworokątny, u topoli – pięciokątny, a u dębu – gwiaździsty. Średnica rdzenia zwiększa się od podstawy pnia do nasady korony, po czym znów maleje.

MECHANIZMY POWSTAWANIA DREWNA

Nowoczesne metody w badaniach procesów fizjologicznych u roślin

Gwałtowne przyspieszenie w identyfikowaniu czynników związanych z kontrolą przemian fizjologicznych na poziomie molekularnym możliwe jest dzięki postępowi, jaki dokonał się w ostatniej dekadzie. U jego podstaw leżą coraz to nowsze i bardziej dokładne, a jednocześnie niezwykle specyficzne techniki badawcze pokazujące zdarzenia, jakie zachodzą już nie tylko na poziomie organizmu czy organu. Możliwym stało się precyzyjne wskazanie zmian jakie następują w wyspecjalizowanych tkankach czy wręcz w pojedynczej komórce. Powszechne stały się metody monitorowania zmian aktywności transkrypcyjnej genów, co pozwala określać ich rolę oraz wskazuje kolejność zdarzeń w szlakach determinujących konkretne procesy komórkowe. Wszelkiego rodzaju odmiany techniki PCR ze szczególnym uwzględnieniem qRT-PCR dają możliwość nie tylko specyficznego identyfikowania zmian aktywności transkrypcyjnej genów, ale wskazują także ich zakres ilościowy [Bustin, 2002]. W większości przypadków techniki te umożliwiają analizę jedynie kilku genów. Dlatego coraz większego znaczenia nabierają metody globalnej analizy aktywności transkrypcyjnej, pozwalające badać nawet tysiące genów. Stosując skonstruowane dla *A. thaliana* panele mikromacierzy, analizie poddać można ponad 20 tys. genów, uwzględniając odmienne warianty doświadczalne i różne przemiany komórkowe. Sondy molekularne stosowane zarówno w najnowszych mikromacierzach, jak również w technice qRT-PCR są wysoce specyficzne i gwarantują wiarygodną i jednoznaczną interpretację uzyskiwanych wyników, co nadaje tempo współczesnym badaniom. Dającym ogromne możliwości poznawcze stało się także indukowanie, w warunkach sztucznych - najczęściej kultur *in vitro* - specyficznych przemian jakim mogą podlegać rośliny. W ten sposób determinowany może być np. kierunek zmian rozwojowych czy aktywność komórek. Prace te w zasadniczej swej części ograniczają się do badań zawiesin komórkowych, ale przemiany w nich zachodzące są niezwykle podobne do tych opisanych w całym organizmie. Pewne uproszczenie, wynikające z mniejszej ilości czynników wpływających na te zmiany, jest tylko ułatwieniem w identyfikowaniu, konstruowaniu przejrzystych i rozumieniu regulatorowych sieci oddziaływań kontrolujących wywoływane sztucznie zmiany metaboliczne i fizjologiczne [Blake i in., 2004].

Zastosowanie specyficznych sekwencji identyfikowanych genów do pomiaru ich aktywności, czy analiza zmian aktywności genów w komórkach indukowanych do prowadzenia pożądanых przemian, było możliwe także dzięki rozpowszechnionym w ostatnich latach technikom sekwencjonowania. Najbardziej użytecznym jest konstruowanie banków EST (*Expressed Sequence Tags*) i ich

sekwencjonowanie. Identyfikacja fragmentów kodujących nie wymaga znajomości całego genomu, oraz ogranicza pulę rozpoznawanych tylko do tych, które w danym stanie metabolicznym i fizjologicznym komórki są aktywne transkrypcyjnie. Porównanie EST z różnych bibliotek w prosty sposób pozwala odpowiedzieć, które z wyselekcjonowanych fragmentów genów są swoiste dla danego procesu. Początkowo badania prowadzono głównie na rzodkiewniku i kilku innych gatunkach roślin zielnych. Obecnie coraz większy krąg zataczają prace, których głównym obiektem badań są również rośliny drzewiaste (sosna, topola). Wspomniane wyżej techniki wymagają niejednokrotnie dodatkowych narzędzi, takich jak sortowanie komórek, mikrodysekcja czy izolacja komórkowo specyficznych mRNA [Asano i in., 2002]. Należy zdawać sobie jednak sprawę, że wszystkie te sposoby podejścia do badań i stosowane w nich metody rozwijają się równolegle. Pozwala to, już nie tylko na ewolucję badań molekularnych nad mechanizmami przemian zachodzących w roślinie, ale wręcz na rewolucję w myśleniu o zmianach zachodzących na poziomie komórkowym i subkomórkowym.

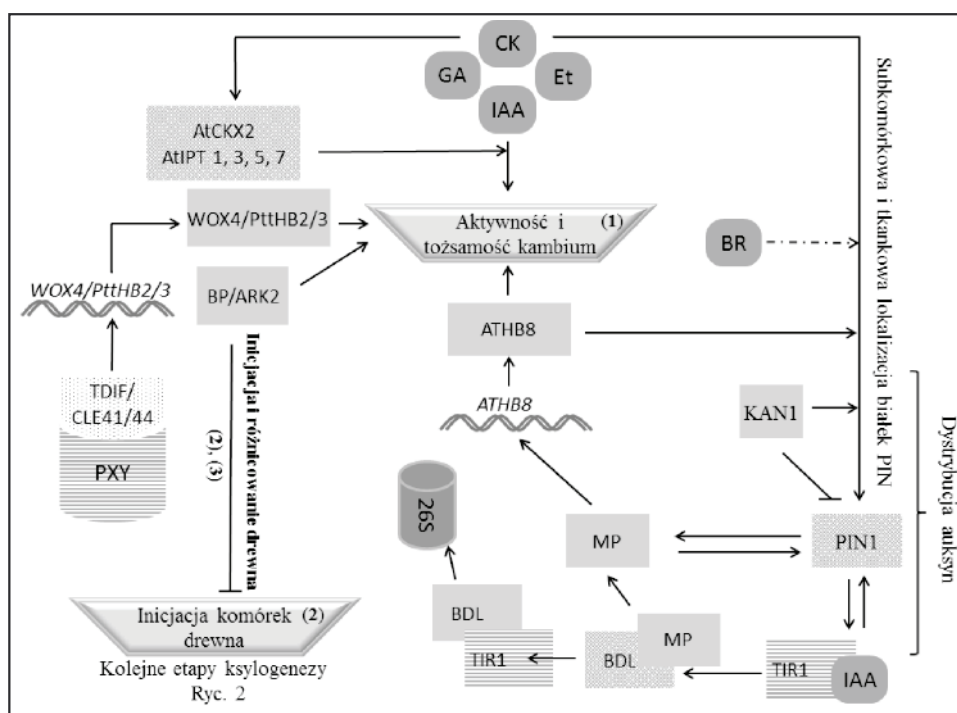
Badania porównawcze prowadzone w ostatniej dekadzie wykazały, że także rośliny zielne mogą podlegać wtórnemu przyrostowi a kolejne etapy przemian, czynniki regulatorowe oraz struktura powstającej tkanki jest zbliżona do funkcjonujących u roślin drzewiastych. W drewnie wtórnym wyróżnić można komórki miększu oraz dwa typy komórek przewodzących wodę. Wyniki prac pokazały, że mechanizmy regulatorowe leżące u podstaw rozwoju pierwotnego i wtórnego roślin są takie same, co świadczy o konserwatywności ewolucyjnej tych procesów. Jednym z najlepiej poznanych gatunków roślin jest *Arabidopsis thaliana* i to on stał się naturalnym modelem badań również nad procesem ksylogenezy. Tym bardziej, że analiza porównawcza wykazała podobieństwo powstających u rzodkiewnika, w korzeniu, łodydze czy w osi kwiatostanu, tkanek wtórnych, do tych występujących u drzew, np. u topoli. Niewątpliwą zaletą *A. thaliana* jest także fakt, iż genom tego gatunku został zsekwencjonowany ponad 10 lat temu. Ułatwia to analizę uzyskiwanych wyników i konstruowanie sieci zależności pomiędzy czynnikami regulatorowymi a elementami odpowiedzi. Znajomość właściwości jednych i drugich pozwala niemal z całą pewnością weryfikować wyniki badań uzyskanych eksperymentalnie. Reasumując, ze względów pragmatyzmu badań korzystniejsze jest opracowanie wstępnych wyników dla gatunków dobrze poznanych np. *Arabidopsis*, a dopiero w następnej kolejności poszukiwania homologicznych czynników i ekstrapolowanie wyników badań na inne gatunki roślin, jak np. drzewa.

Utrzymywanie tożsamości i aktywności kambium

Pierwszym etapem rozwoju drewna wtórnego są podziały komórek pre-prokambium. Mnożące się komórki stanowią źródło ksylemu decydując w ten

sposób o przyroście biomasy rośliny. Jak pokazały badania przeprowadzone na *Arabidopsis thaliana* samo powstawanie prokambium i utrzymanie tożsamości tych komórek gwarantujące im pluripotencję/totipotencję jest wynikiem współdziałania hormonów. Uczestniczą w tym procesie głównie auksyny i cytokininy. Nie można jednak zapominać o interakcjach pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi i czynnikami regulatorowymi aktywowanymi, bądź hamowanymi, w wyniku pojawiania się hormonu. Wszystkie te czynniki modulują aktywność genów niezbędnych do zainicjowania podziałów a jednocześnie utrzymania stanu pierwotnego tylko w niewielkiej grupie komórek. Podstawowym sygnałem dla powstania prokambium jest ukierunkowany przepływ auksyn. Jak pokazały prowadzone już od wielu lat badania transport tego hormonu zależny jest od obecności w komórkach specyficznych przekaźników auksyny kodowanych przez grupę genów *PIN* (*PINFORMED*). Wyniki tych doświadczeń prowadzonych na *A. thaliana* pokazały jednoznacznie, że różnicowanie się komórek poprzedzone jest wzrostem aktywności transkrypcyjnej *PIN1*, a tym samym nagromadzeniem się tego białka w odpowiednich kompartmentach komórki. Pojawienie się w komórce gradientu auksyn, wywołanego przez specyficzne przekaźniki a także przez współdziałanie tego hormonu z cytokininami, powoduje zmiany aktywności transkrypcyjnej szeregu genów. Badania molekularne wykazały, że przebieg szlaku transdukcji sygnału auksyn u *Arabidopsis* jest niemal identyczny z opisanymi u innych gatunków roślin i w innych procesach fizjologicznych. *MP* (*MONOPTEROS*), jeden z pierwszych zidentyfikowanych genów zaangażowany w sygnalizację auksynową, koduje czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek ARF (Auxin Response Factor) (Ryc.1). Mutacja w tym genie powoduje zaburzenia budowy podłużnej osi ciała oraz ograniczenie rozwoju naczyń. Inne zidentyfikowane mutanty charakteryzowały się bardzo podobnymi cechami fenotypowymi. Jak pokazały badania były one wywołane uszkodzeniem genów *BDL* (*BODENLOS*) oraz *AXR6/AtCUL1* (*AUXIN-RESISTANT6/ARABIDOPSIS CULLINI*). Kodują one odpowiednio białko AUX/IAA, wiążące się bezpośrednio z receptorem auksyn i czynnikiem transkrypcyjnym MP oraz białko wchodzące w skład kompleksu ligazy ubikwityny, należące do rodziny CULLIN/CDC53 [Ilegems i in., 2010, Carlsbecker i in., 2010]. Brak auksyny w komórce powoduje, że czynnik regulatorowy BDL wiąże się z MP blokując jego aktywność, czego końcowym efektem jest zahamowanie odpowiedzi na hormon na poziomie zmian aktywności transkrypcyjnej genów. Receptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), będący jednym z białek kompleksu SCF (SKP1, CULLIN/CDC53, F-box Protein), wiąże się specyficznie z auksyną i inicjuje degradację czynników AUX/IAA przy udziale całego kompleksu ligazy ubikwityny i aktywności proteasomów (Ryc.1). Uwolniony z kompleksu MP/BDL czynnik transkrypcyjny MP wiąże się do promotorów genów determinujących rozwój naczyń indukując ich ekspresję.

Jak wykazały badania, utrzymanie tożsamości komórek merystematycznych i zachowanie ich specyficznych właściwości w kambium podlega bardzo podobnym mechanizmom, jak te zidentyfikowane w merystemach wierzchołkowych pędu oraz korzenia (SAM i RAM). Populacja podlegających podziałom komórek łodygi w merystemie wierzchołkowym pędu utrzymywana jest przez dynamiczne sprzężenie zwrotne z udziałem czynnika transkrypcyjnego WUSCHEL (WUS), peptydowego ligandu CLAVATA3 (CLV3) i receptora CLV1,



Ryc. 1. Schemat proponowanych mechanizmów kontroli tożsamości merystematycznej oraz aktywności komórek kambium. Funkcjonowanie kambium regulowane jest przez fitohormony, przede wszystkim auksyny (IAA) i cytokiny (CK) oraz peptyd sygnałny TDIF/CLE41/42, które utrzymują odpowiedni poziom białka WOX4/PttHB2/3, blokującego wraz z białkami BP/ARK2 różnicowanie komórek kambium (drewna?). Białko ATHB8, należące do rodziny czynników transkrypcyjnych z domeną HD-ZIP III, jest istotne dla tworzenia i funkcjonowania pro-kambium. Jego poziom regulowany jest przez auksynę za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego MP, należącego do rodziny białek ARF (Auxin Response Factors). Aktywność białka MP blokowana jest przez białko BDL, które usuwane jest na drodze proteolitycznej degradacji w proteasomie 26S. W procesie proteolitycznej degradacji BDL uczestniczy receptor auksyn TIR1. Białka KAN kontrolują aktywność kambium działając negatywnie na polarny transport auksyn. AtCKX i AtIPT – enzymy odpowiedzialne za metabolizm cytokinin; BR, Et, GA – brasinosteroidy, etylen, gibereliny; PIN – przenośnik polarnego transportu auksyn; PXY- receptor peptydu sygnałnego TDIF/CLE41/42. Nazwy genów zaznaczono kursywą. Numery w nawiasach oznaczają kolejne etapy powstawania drewna

Źródło: Opracowanie własne.

natomiast w wierzchołku korzenia przez, homologa WUS, białko WOX5 (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5) i peptyd sygnałowy CLE40 [Sarkar i in., 2007, Stahl i in., 2009]. Czynnikiem zaangażowanym w utrzymanie tożsamości i aktywności komórek kambium jest natomiast peptyd sygnałowy TDIF (the tracheary element differentiation inhibitory factor). TDIF i jego odpowiednik CLE41/44 (CLAVATA3/ESR-RELATED 41/44) opisany u *Arabidopsis*, kodowane przez geny z rodziny *CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE)*, zaangażowane są w sygnalizację międzykomórkową bliskiego zasięgu (Ryc. 1) [Ito i in., 2006; Fukuda i in., 2007]. TDIF hamuje transdyferencjację elementów trachealnych w kulturach komórkowych *Zinnia elegans* i sprzyja proliferacji komórek pro-kambialnych w hypokotylach i liściach u *Arabidopsis* [Hirakawa i in., 2008]. Receptorem TDIF jest bogata w powtórzenia leucynowe kinaza białkowa typu LRR-RLK o nazwie TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR RECEPTOR (TDR). Receptor ten jest również nazywany PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY), ponieważ początkowo sklonowano go z mutantą *pxy*, który wykazał defekt w pozycjonowaniu drewna i łyka podczas powstawania wiązek przewodzących [Fisher i Turner 2007]. PXY/TDR wymagany jest do podtrzymania normalnego polarnego podziału komórek pro-kambium i organizacji przestrzennej wiązek przewodzących u *Arabidopsis* [Hirakawa i in., 2008, Etchells i Turner, 2010]. Zasadniczą funkcją układu PXY-CLE41/CLE44 jest tłumienie różnicowania komórek naczyniowych łydgi w komórki drewna. W ten sposób utrzymywana jest nieodróżniona pula komórek kambium zachowująca stan totipotencji. Docelowym genem regulowanym pośrednio przez TDIF jest m.in. *WOX4 (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4)*, ortolog genu *WUS*, którego ekspresja wykryta została w prokambium/kambium u *Arabidopsis* i pomidora [Ji i in., 2010], a jego homologi *PttHB2* i *PttHB3* zidentyfikowano także jako aktywne transkrypcyjnie w kambium topoli (Ryc.1). U mutantów *wox4* i *tdr wox* stwierdzono silne hamowanie podziałów komórek prokambium i kambium, co pokazuje, że zasadniczą funkcją tego układu jest genetyczna kontrola proliferacji tego rodzaju komórek merystematycznych [Hirakawa i in., 2010]. Jak dowodzą badania porównawcze, podobny schemat mechanizmów utrzymania tożsamości merystematycznej i regulacji podziałów tych komórek występuje także u roślin drzewiastych [Schrader i in., 2004].

Równie istotnymi, jak wspomniane powyżej, czynnikami determinującym podziały komórek, a w konsekwencji proces ich różnicowania, są białka z rodziny KNOX. Zidentyfikowane u *Arabidopsis* czynniki transkrypcyjne KNOX klasy I są głównymi regulatorami aktywności SAM. Zarówno rośliny z nadekspresją jednego z takich genów, *BREVIPEDICELLUS (BP)/KNAT1*, jak i mutanty *bp* wykazywały liczne zaburzenia odkładania ligniny oraz niewłaściwy przebieg procesu drewnienia w pędzie kwiatostanowym. Obserwacje te potwierdzają kluczową rolę BP w prawidłowym różnicowaniu komórek ksylemu podczas rozwoju naczyń

[Mele i in., 2003]. Funkcja czynników transkrypcyjnych KNOX zachowywana jest nie tylko międzygatunkowo. Wykazano doświadczalnie, że ARBORKNOX2 (ARK2), ortolog *BP* występujący u topoli, ulega ekspresji zarówno w SAM, jak i w regionach kambium (Ryc.1). Nadekspresja tego genu prowadzi jednocześnie do rozbudowy strefy kambium i hamowania różnicowania elementów trachealnych i włókien w ksylemie. Obniżenie aktywności transkrypcyjnej *ARK2* skutkuje przedwczesną lignifikacją i nadmiernym zgrubieniem wtórnej ściany komórkowej [Du i in., 2009].

Regulacja aktywności kambium kontrolowana jest przez cytokininy (CK), auksyny (IAA), gibereliny (GA) i etylen (Et) [Elo i in., 2009]. W każdym przypadku sam mechanizm związany jest ze zmianami aktywności transkrypcyjnej wielu genów kodujących m.in. czynniki transkrypcyjne, peptydowe cząsteczki sygnałowe, białka receptorowe, przenośnikowe czy regulujące stabilność, aktywność i trwałość innych białek.

Badania funkcjonalne prowadzone zarówno na *Arabidopsis* jak i *Populus* sugerują, że zależny od cytokinin szlak transdukcji sygnału reguluje jednocześnie utrzymanie tożsamości merystematycznej jak i proliferację komórek prokambium/kambium [Mähönen i in., 2006, Hejátko i in., 2009]. Wykorzystując do badań poczwórne mutanty *A. thaliana atipt1,3,5,7*, pozbawione aktywności czterech kluczowych enzymów biosyntezy cytokinin wykazano, że uszkodzenia w tych genach, prowadzą do zmniejszenia średnicy łodygi [Matsumoto-Kitano i in., 2008]. Podobny efekt fenotypowy w postaci zahamowania promieniowego wzrostu łodygi *Populus* obserwowano u roślin transgenicznych do których wprowadzano gen *Arabidopsis thaliana* kodujący enzym degradujący cytokininy (*AtCKX2 - CYTOKININ OXIDASE 2*) (Ryc.1). Przyczyną obserwowanej zmiany była ograniczona proliferacja komórek kambium [Nieminen i in., 2008]. Jak pokazały badania szczegółowe przeprowadzone na topoli, aktywność transkrypcyjna genów kodujących receptory cytokinin oraz geny wczesnej odpowiedzi na ten hormon (*PtRR7*) występowała głównie w strefie kambium. Równie ważną, jeśli nie najważniejszą w mechanizmach regulacji aktywności tego rodzaju komórek merystematycznych jest auksyna. Wykazano, że nadekspresja zmutowanego genu *IAA3 (PttIAA3m)* u *Populus* prowadzi jednocześnie do zahamowania podziałów komórkowych kambium i promieniowego przyrostu łodygi na grubość [Nilsson i in., 2008]. W przypadku auksyn i cytokinin można uważać, że działają one antagonistycznie na etapie utrzymania tożsamości merystematycznej kambium i różnicowania się komórek drewna, natomiast w regulacji aktywności kambium działają synergistycznie. Równoczesne podawanie obydwu fitohormonów na roślinę wywołuje zdecydowanie szybsze podziały komórek kambium niż efekt spowodowany działaniem każdego z hormonów osobno [Björklund i in., 2007]. Wszystkie badania przeprowadzono na topoli, ale zależności opisane powyżej dotyczą także roślin zielnych. Podobnie jak to ma miejsce w przypadku zależności

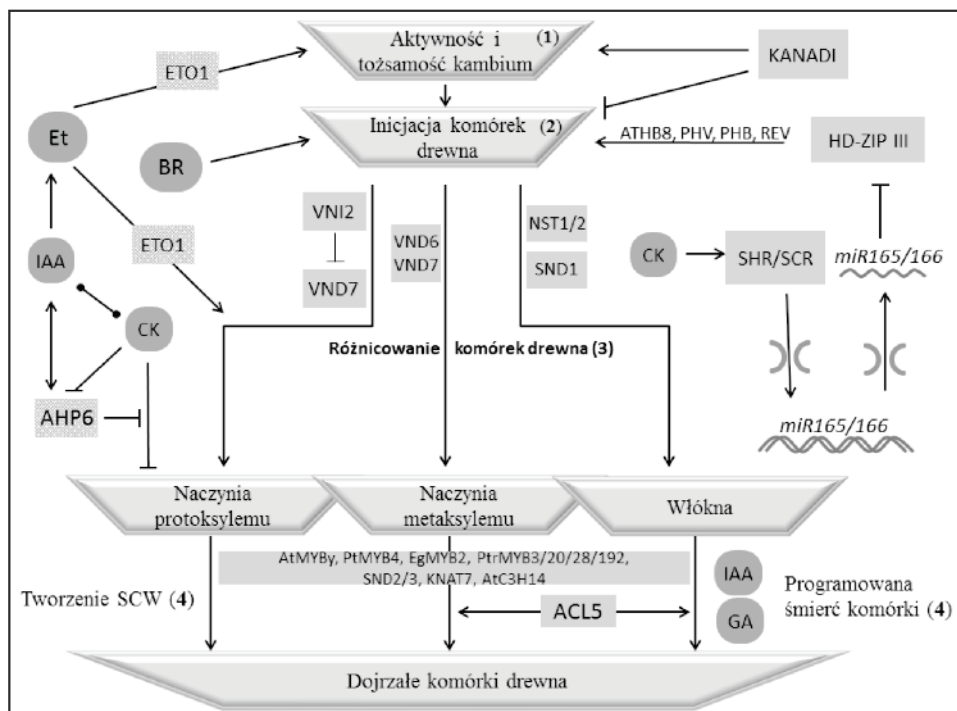
między cytokininą a IAA, wpływ etylenu na wydłużanie się korzenia u *A. thaliana* a także aktywność kambium, może być wynikiem działania auksyny. Obserwacje te potwierdzają badania aktywności transkrypcyjnej genów biosyntezy etylenu [Nilsson i in., 2008]. Równocześnie wykazano, że nadekspresja genu *PttACO1* w liniach roślin transgenicznych *Populus*, a także mutacja genu kodującego receptor etylenowy *ETR1* (*ETHYLENE RESPONSE 1*) u *Arabidopsis*, stymulują podziały komórek kambium i tworzenie drewna [Love i in., 2009].

Inicjacja komórek drewna

Badania prowadzone początkowo nad mechanizmami ustanowienia osiowo-obwodowej orientacji organów i tkanek pozwoliły zidentyfikować niewielkie grupy genów bezpośrednio zaangażowane w przestrzenną organizację wiązek przewodzących, w tym tworzenie się drewna. Pierwsza z nich obejmuje czynniki transkrypcyjne zawierające charakterystyczną domenę zamka leucynowego określone mianem HD-ZIP III, opisane początkowo jako regulatory polarnego rozwoju blaszki liściowej u *Arabidopsis thaliana*. Druga grupa to białka KANADI, należące do rodziny czynników transkrypcyjnych GARP. Zmiany ekspresji genów *HD-ZIP III*, zarówno pozytywne jak i negatywne, spowodowane odpowiednio wzmocnieniem aktywności transkrypcyjnej, jak i mutacjami ją osłabiającymi, powodowały odmienny układ drewna i łyka w wiązkach przewodzących. Układ w którym drewno otacza floem (amphivasal) spowodowany był wzmocnieniem aktywności genów *PHB* (*PHABULOSA*), *PHV* (*PHAVOLUTA/ATHB-9*), (*ATHB-8*) i *REV* (*REVOLUTA*). Odmienny obraz obserwowano w przypadku potrójnych mutantów wspomnianych genów *HD-ZIP* klasy III. Utrata funkcji tych genów powoduje, że ksylem otoczony jest komórkami łyka (amphicribal) [McConnell i in., 2001, Emery i in., 2003, Cano-Delgado i in., 2010]. Najnowsze badania prowadzone na rzodkiewniku wykazały, że drewno powstaje pod wpływem działania wszystkich 5 znanych czynników HD-ZIP III. Brak tych białek w korzeniach powoduje całkowite zahamowanie rozwoju drewna.

Dzięki badaniom nad wzmocnieniem funkcji wymienionych genów zidentyfikowano mechanizm, poprzez który te czynniki transkrypcyjne są kontrolowane. Wykazano, że mRNA genów *HD-ZIP III* jest celem dla aktywności regulatorowego RNA. Do transkryptów tych genów wiążą się specyficznie cząsteczki mikroRNA 165/166 powodując w konsekwencji zahamowanie translacji i brak funkcjonalnych białek (Ryc.2). Wspomniane już wzmocnienie funkcji to nic innego, jak mutacja w domenie START wiążącej lipidy/sterole [McHale i Koning, 2004 Ko i in., 2006]. W obrębie tej sekwencji zlokalizowany jest także fragment rozpoznawany przez miR165/166. Wprowadzane zmiany wywołują niezdolność wiązania regulatorowego RNA do docelowego transkryptu, co powoduje podwyższenie stabilności mRNA genów *HD-ZIP III* i efektywną syntezę białek. Nadekspresja miR165 hamuje translację wszystkich pięciu genów *HD-ZIP III*

i wywołuje fenotypy charakterystyczne dla mutantów pozbawionych aktywności HD-ZIP III [Zhong i Ye, 2007]. W czasie pierwotnego wzrostu korzenia u *Arabidopsis* wykazano, że miRNA165/166 syntetyzowane są w endodermie. Ekspresja tych genów miR kontrolowana jest przez zależne od cytokinin czynniki



Ryc. 2. Schemat proponowanych mechanizmów regulacji procesów różnicowania komórek drewna. Istotną rolę w procesie różnicowania się peryferycznych komórek kambium w kierunku drewna odgrywają czynniki transkrypcyjne HD-ZIP klasy III i KANADI. Poziom białek HD-ZIP III kontrolowany jest przez syntetyzowane w sąsiednich tkankach miRNA165/166. Ekspresja tych genów kontrolowana jest przez zależne od cytokinin czynniki transkrypcyjne SHR/SCR. Poziom białek HD-ZIP III kontrolowany jest także przez auksyny, których lokalizacja zależna jest m.in. od tych czynników transkrypcyjnych (mechanizm kontroli ekspresji białek HD-ZIP III przez auksyny pokazano na Ryc. 1). Specjacja komórek drewna znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych z rodziny NAC. VND2, 6 i 7 odpowiadają za rozwój meta- i protoksylemu, natomiast NST1 i SND1/2 za rozwój włókien i powstawanie w tych komórkach wtórnej ściany komórkowej(SCW). Różnicowanie komórek drewna kontrolowane jest na różnych etapach przez m.in. auksyny (IAA), cytokininy (CK), gibereliny (GA) i etylen (Et). Istotne znaczenie w regulacji tworzenia protoksylemu ma białko AHP6, ograniczające sygnalizację cytokinin, którego ekspresja aktywowana jest przez auksyny. Wytwarzanie wtórnej ściany komórkowej i programowana śmierć komórek prowadzące do wytworzenia dojrzałych komórek drewna regulowane są przez szereg białek z rodziny MYB, NAC i KNOX (KNAT7). Istotne w tym procesie są także poliaminy, których biosynteza katalizowana jest przez syntazę ACL5. ETO1 – białko kontrolujące poziom etylenu. Nazwy genów zaznaczono kursywą. Numery w nawiasach oznaczają kolejne etapy powstawania drewna
Źródło: Opracowanie własne.

transkrypcyjne SHR/SCR (SHORT-ROOT/SCARECROW) (Ryc.2) [Cui i in. 2011]. Zasugerowano niedawno, że miRNA165/166, podobnie jak IAA, może działać jako morfogen [Miyashima i in. 2011]. Niewielka masa cząsteczkowa tych regulatorowych RNA powoduje, że mogą być one przenoszone z komórki do komórki. W ten sposób cząsteczki te transportowane z lokalnego źródła, wpływają na sąsiednie tkanki decydując o ich losach. Podczas gdy *HD-Zip III* ulegają ekspresji głównie w komórkach pre- i prokambialnych i promują różnicowanie drewna, geny KAN ulegają ekspresji głównie w łyku i wydają się działać antagonistycznie w specjacji tkanek przewodzących [Kerstetter i in., 2001; Ilegems i in., 2010] Ekspresja *KANI* ma negatywny wpływ na ekspresję oraz polarne umiejscowienia białka PIN1, co skutkuje hamowaniem tworzenia się prokambium we wczesnych etapach embriogenezy *Arabidopsis* [Ilegems i in., 2010]. Powszechnie wiadomo, że ekspresja genów *HD-Zip III* jest zgodna ze wzorem dystrybucji auksyn w tkankach [Izhaki i Bowman 2007], co oznacza, że auksyny stymulują ekspresję tych genów. Sugeruje to, że białka KAN kontrolują aktywność kambium działając negatywnie na transport auksyn, natomiast *HD-Zip III* promują różnicowanie drewna poprzez udział w ukierunkowywaniu przepływu auksyny (Ryc.2) [Ilegems i in., 2010].

Można wobec tego stwierdzić, że ilość *HD-ZIP III* zależna od gradientu mikroRNA 165/166 oraz aktywność genów KAN decydują o przeznaczeniu i kierunku rozwoju wiązek przewodzących w walcu osiowym. Typowym przełącznikiem genetycznym uruchamianym w odpowiedzi na auksyny jest gen *MP* (Lau i in., 2011). Identyczne mechanizmy decydujące o charakterze komórek wiązek przewodzących opisano u topoli i eukaliptusa. *PtaHBI* homolog *REV/IFL1* ulega wzmożonej ekspresji w tkankach wtórnych, a ilościowy poziom transkryptu jest negatywnie skorelowany z poziomem miR166 [Ko i in., 2006]. Wskazuje to jednoznacznie na ewolucyjne zachowywanie tych mechanizmów u różnych grup roślin.

Molekularne mechanizmy różnicowanie drewna

Ostatnie badania prowadzone na indukowanych w kierunku tworzenia elementów trachealnych kulturach *in vitro* *A. thaliana* pozwoliły zidentyfikować kilka grup genów istotnych dla różnicowania komórek drewna. Pierwszą z nich to geny kodujące białka VND należące do rodziny czynników transkrypcyjnych NAC. Zastosowanie technik tłumienia ekspresji czy niewłaściwej ekspresji dwóch z nich *VND 6* i *7* (*VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 6* i *7*) pokazało, że są one odpowiedzialne bezpośrednio za różnicowanie komórek odpowiednio w meta- i protoksylem (Ryc.2). Zidentyfikowano także kilka innych genów należących do rodziny NAC. *VND-INTERACTING2* (*VNI2*) hamuje aktywność transkrypcyjną genów zależnych od *VND7*, specyficznych dla rozwoju naczyń. Dwa inne białka, *NST1* (*NAC TRANSCRIPTION FACTOR NST1*) i *SND1* (*NAC SECONDARY*

WALL THICKENING PROMOTING 3), należące do tej samej rodziny czynników transkrypcyjnych kontrolują proces odkładania się wtórnych ścian komórkowych (SCW) (Ryc.2). Co ciekawe, pozbawienie funkcji genu *VND7* hamuje całkowicie powstawanie naczyń w korzeniu i łodydze rzodkiewnika. Podobne zależności zaobserwowano u *Populus*, co wskazuje na powszechność tych mechanizmów. Potwierdzeniem tego jest też fakt zidentyfikowania w genomie *Populus* grupy genów kodującej czynniki transkrypcji z domeną NAC (*PtrWNDs*) [Zhong i in., 2010].

Zakończenie wzrostu komórek inicjuje etap odkładania celulozy, ksylanu i lignin w ścianach komórkowych włókien i elementów przewodzących drewna. Przypuszcza się, że w mechanizm ten zaangażowane są wspomniane już w poprzednim rozdziale białka rodziny NAC. Ich zasadniczą rolą na tym etapie rozwoju jest kontrola leżących poniżej w kaskadzie zdarzeń genów, kodujących m. in. czynniki transkrypcyjne MYB. Dwa spośród nich *MYB46* i *MYB83* zidentyfikowano jako bezpośrednio regulowane przez *SND1* (Ryc.2). Wykazano, że funkcjonują one także równolegle w regulacji powstawania wtórnej ściany komórkowej [Zhong i in., 27, McCarthy i in., 2009]. Za proces pogrubiania wtórnej ściany komórkowej odpowiedzialne są również białka MYB. Wykazano, że 11 z nich wspólnie z *KNAT7*, *AtC3K14* oraz dwoma dodatkowymi czynnikami transkrypcyjnymi NAC odpowiedzialne są za ten etap (Ryc.2). Na podstawie analizy mutantów oraz zastosowania roślin transgenicznych zidentyfikowano podobne czynniki regulujące tworzenie wtórnych ścian komórkowych u sosny (*PtMYB4*), eukaliptusa (*EgMYB2*) i topoli (*PtrMYB3*, *PtrMYB20*). Nadekspresja *PtrMYB3* i *PtrMYB20* w transgenicznych liniach rzodkiewnika skutkowałą zwiększonym odkładaniem celulozy, ksylanów i lignin [McCarthy i in., 2010]. Na podstawie badań międzygatunkowych potwierdzono także, że występujące u topoli *PtrMYB28* i *PtrMYB192* są ortologami *MYB58* i *MYB63*. Nilsson i współpracownicy [Nilsson i in., 2008] wykazali istotne znaczenie auksyn także na tym etapie różnicowania komórek drewna. Porównanie ekspresji genów odpowiedzi na auksynę wykazało istotne różnice ich aktywności w komórkach kambium i rozwijających się komórkach drewna. Choć stężenie auksyn w kambium jest wyższe, to jednak ilość mRNA tych genów jest większa w wykształconych komórkach drewna. Postuluje się, że dodatkowymi czynnikami w regulacji różnicowania drewna są także GA i etylen, które stymulują m. in. wydłużanie i ilość włókien oraz podziały promieniowe drewna [Mauriat i Moritz, 2009].

Ostatnim etapem ksylogenezy jest sprzężona z odkładaniem i modyfikacją wtórnej ściany komórkowej programowana śmierć komórki. Badania molekularne pozwoliły zidentyfikować poza genami czy białkami odpowiedzialnymi za te procesy, także elementy regulatorowe typu cis TERE (tracheary-element-regulating cis-element), zlokalizowane w promotorach genów odpowiedzialnych za przebieg PCD i tworzenie SCW. W wyniku prac prowadzonych na *A. thaliana* oraz *Zinnia elegans* opisano czynniki zapobiegające przedwczesnej śmierci komórki. Białko

ACAULIS5 (ACL5) będące syntazą termosperminy oraz XND1 należące do rodziny NAC, umożliwiają całkowity rozwój i rozbudowę komórek drewna włączając w to SCW (Ryc.2) [Muñiz i in., 2008, Zhao i in., 2008].

Brasinosteroidy, etylen i gibereliny

Wszystkie z opisanych powyżej etapów różnicowania i rozwoju drewna mogą być regulowane dodatkowo także przez inne czynniki. W różnicowaniu się komórek drewna ważną rolę odgrywają również brasinosteroidy (BR), etylen i gibereliny. Wyniki prac nad szlakami transdukcji sygnałów i odpowiedziami na te czynniki wykazały, że regulują one częściowo te same białka i geny, które opisano wcześniej dla cytokinin i auksyn (Tab.1).

Wykazano np., że podobnie jak auksyny również brasinosteroidy kontrolują poziom białek HD-Zip III. Mutanty *Arabidopsis* z niedoborem tego fitohormonu są skrajnie karłowate z ograniczoną ilością drewna [Choe i in., 1999]. Brasinosteroidy syntetyzowane w komórkach prokambialnych odbierane są przez receptory w komórkach prekursorowych drewna, gdzie stymulują różnicowanie ksylemu przez zwiększenie ekspresji genów *HD-zip III* [Caño-Delgado i in., 2004, Fukuda 2004]. Dodatkowo wzrost poziomu HD-zip III, wpływa na biosyntezę BRL3 i BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE RECEPTOR-1), białek układu receptorowego brasinosteroidów [Ohashi-Ito i in., 2005].

Wykazano, że szlaki sygnałowe brasinosteroidów i auksyn zbiegają się na wspólnym zestawie genów docelowych, co sugeruje, synergistyczne działania tych fitohormonów. Działanie to przejawia się między innymi we wzajemnej regulacji poziomu każdego z nich. Ponadto, wydaje się, że BR wpływają na polarny transport auksyn [Li i in., 2005].

Ostatnie prace z wykorzystaniem transgenicznych drzew z defektem percepcji etylenu wykazały, że etylen stymuluje podziały komórek kambium [Love i in., 2009]. Stymulujący wpływ etylenu na tworzenie drewna obserwowano także u mutantu *eto1 (ethylene overproducer1) Arabidopsis*. Wykazano, że etylen spełnia podwójną funkcję w rozwoju naczyń. Z jednej strony stymuluje tempo różnicowania elementów trachealnych, a z drugiej kontroluje wielkość populacji komórek macierzystych podczas przyrostu wtórnego rośliny [Pesquet i Tuominen 2011].

Wpływ giberelin na różnicowanie wiązek wskazuje, że także one współuczestniczą w regulacji mechanizmów powstawania drewna. Nadekspresja *GIBBERELLIN 20 OXIDASE1 (GA20ox)*, genu biosyntezy GA, powoduje u *Populus* zwiększenie tempa wzrostu i długości włókien w drewnie [Eriksson i in., 2000]. Z kolei obniżony poziom giberelin skutkuje zmniejszeniem przyrostu wtórnego [Mauriat i in., 2011]. W tworzeniu drewna gibereliny, podobnie jak BR, współdziałają synergistycznie z auksynami. Dodatkowo, auksyny stymulują biosyntezę giberelin, a te z kolei zwiększają ich polarny transport. Mutanty

Arabidopsis z zahamowaną biosyntezy i dysfunkcjami sygnalizacji giberelin wykazują obniżoną ilość białek PIN1, PIN2 i PIN3 [Willige i in., 2011].

PODSUMOWANIE

Ksylogeneza jest wieloetapowym procesem przemian prowadzącym w konsekwencji do wytworzenia drewna wtórnego. Każdy z opisanych wcześniej etapów regulowany jest przez sieć zależności opartych na pozytywnych lub negatywnych oddziaływaniach regulatorów wzrostu i rozwoju. Najważniejszymi z nich są fitohormony zwłaszcza auksyny i cytokininy, które poprzez szereg regulowanych przez nie białek i genów wymuszają zachodzenie swoistych przemian. Badania prowadzone na przestrzeni ostatniej dekady pozwoliły zidentyfikować co najmniej kilkadziesiąt czynników białkowych regulowanych przez te hormony. Większość prac wykonano początkowo na roślinach zielnych ale dalsze badania potwierdziły, że niemal identyczne przemiany zachodzą także u drzew. Profilowanie ekspresji genów oraz identyfikacja białek wykazały, że u jednych i drugich funkcjonują podobne mechanizmy. Dzięki zebraniu wszystkich uzyskanych danych możliwe jest przedstawienie ogólnego schematu mechanizmów determinujących rozwój tkanek wtórnych u wszystkich roślin. Kolejne etapy tych przemian kontrolowane są przez rozbudowaną sieć zależności między wszystkimi wymienionymi powyżej czynnikami komórkowymi.

Od dawna wiadomo, że inicjowanie komórek pro-kambialnych zależy od sygnalizacji i transportu auksyny. Przepływ auksyny wywołuje podziały komórek kambium i, przy malejącym stężeniu, powstawanie ksylemowych i floemowych pochodnych komórek miazgi. Skutkiem tego jest zapoczątkowanie etapu ich dojrzwania, kiedy to następuje wytworzenie wtórnej ściany komórkowej i lignifikacja. Przyjmuje się, że auksyna działa jako morfogen określający przeznaczenie różnicujących się komórek. W modelu tym, gradient hormonu stanowi informację i ustala zmiany aktywności transkrypcyjnej genów zależnych od IAA. W kambium, które jest główną drogą przepływu auksyny wzdłuż łodygi u drzew [Uggla i in., 1998], ekspresja genów zależnych od wysokich stężeń IAA przyczynia się do utrzymywania populacji komórek niezróżnicowanych, natomiast inne geny, które ulegają ekspresji przy niższych stężeniach auksyny stymulują rozwój komórek drewna czy łyka [Bhalerao i Bennett 2003]. Przestrzenna informacja nie ogranicza się tylko do wyznaczania położenia drewna i łyka, ale ma wpływ także na przebieg różnicowania się komórek drewna wzdłuż osi pionowej rośliny. Wysoki poziom auksyn w pobliżu młodych liści indukuje powstawanie wąskich naczyń z powodu ich szybkiego różnicowania, ograniczającego czas wzrostu komórek. Natomiast niższe stężenia auksyny w niższych partiach rośliny skutkują spowolnieniem różnicowania, co pozwala na większą ekspansję komórek

zanim powstanie wtórna ściana komórkowa. Kontrola wielkości naczyń jest istotna dla zapewnienia właściwego wznoszenia się wody i substancji mineralnych od korzeni do liści. W okresach spoczynku podziały komórek kambialnych ustają z powodu spadku wrażliwości tej tkanki na auksynę [Baba i in., 2011]. Skutkiem zmniejszenia wielkości strumienia auksyny przepływającej przez kambium jest wyraźna różnica w morfologii drewna wczesnego i drewna późnego. Gradient auksyny, z maksimum w strefie kambialnej, był od dawna uważany za istotny czynnik dla proliferacji tej tkanki, ale dopiero ostatnio ujawniono mechanizmy molekularne leżące u podstaw tych procesów.

Oprócz auksyn istotne w podtrzymywaniu i proliferacji komórek kambium są również cytokininy (CK). Są one jednak negatywnymi regulatorami tworzenia drewna. Przekazywanie sygnałów przez cytokininy zachodzi z udziałem regulatorów odpowiedzi ARR typu A i B (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS) [Kieber i Schaller, 2010]. W komórkach kambium utrzymuje się wysoki poziom ekspresji zarówno genów *ARR*, jak i genów receptorów tego fitohormonu *CRE1* (*CYTOKININ RECEPTOR ATAHK4-LIKE PROTEIN1*), *AHK2* (*HISTIDINE KINASE 2*) i *AHK3* (*HISTIDINE KINASE 2*), co podkreśla ich znaczenie dla regulacji proliferacji i/lub utrzymania tożsamości tych komórek w pędach. Istotne znaczenie w regulacji tworzenia protoksylemu ma białko *AHP6* (*HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6*) [Mähönen i in., 2006]. Działając jako inhibitor sygnalizacji cytokininy, ogranicza jej aktywność, umożliwiając różnicowanie drewna. Ekspresja genu *AHP6* jest aktywowana przez auksyny. Tak więc stosunek ilości auksyn do cytokinin ma fundamentalne znaczenie dla równowagi pomiędzy proliferacją i różnicowaniem się linii komórkowych wywodzących się z kambium. Tworzenie protoksylemu w wiązках korzenia jest stymulowane przez wysokie stężenia auksyny i niskie stężenia CK, natomiast komórki prokambialne wymagają wysokiego stężenia CK i niskiego auksyn [Bishopp i in., 2011]. CK w komórkach prokambialnych promuje ekspresję genów *PIN* i boczną lokalizację białek *PIN*, wymuszając w ten sposób lateralny przepływ auksyny od komórek prokambialnych do komórek merystematycznych,

z których następnie powstaje protoksylem. Istotnym elementem regulacji jest tu również należący do rodziny białek GRAS czynnik transkrypcyjny *SHORT-ROOT* (*SHR*), który ulega ekspresji w protoksylemie, a który bezpośrednio reguluje aktywność oksydazy cytokininowej (*CKX3*), katalizującej degradację cytokininy [Nakajima i in., 2001]. Z drugiej strony, białka *ARR* typu B (*ARR1* i *ARR12*), hamują ekspresję genu *SHORT HYPOCOTYL 2* (*SHY2/IAA3*), który należy do genów *Aux/IAA*, kontrolujących odpowiedzi na auksynę. Produkt genu *SHY2/IAA3* hamuje m.in. ekspresję genów *PIN*, ale również biosyntezę CK. Ekspresja genu *SHY2/IAA* hamowana jest przez *IAA*. Należy dodać, że niemal każdy z etapów różnicowania i rozwoju drewna w mniejszym lub większym stopniu

Tab. 1. Udział fitohormonów w kontroli rozwoju drewna. Na podstawie Sorce i in., [2013]

Fitohormon	Rola
Auksyna	Stymulacja podziałów komórek i utrzymywanie komórek kambium w stanie niezróżnicowanym (wysokie stężenia). Stymulacja wzrostu inicjalnych komórek drewna i dojrzewanie drewna (niskie stężenia).
	Zwiększanie zagęszczenia komórek naczyniowych w drewnie.
Cytokiny	Stymulacja podziałów komórek kambium i różnicowanie elementów trachealnych (z auksyną).
Brasinoosteroidy	Stymulowanie podziałów komórek prokambium.
	Stymulacja programowanej śmierci komórki i odkładanie wtórnej ściany komórkowej podczas różnicowania elementów trachealnych drewna.
Gibereliny	Stymulacja proliferacji komórek kambium (wspólnie z auksyną) i wydłużenia włókien drzewnych.
ABA	Zahamowanie wzrostu kambium poprzez prawdopodobne negatywne interakcje z auksyną.
Etylen	Promowanie podziałów i ekspansji komórek kambium (szczególnie w drewnie reakcyjnym).
Strigolactony	Stymulacja podziałów komórek kambium.

Źródło: Opracowanie własne.

wymaga współdziałania ze sobą różnych fitohormonów. Wszystkie z klasycznych fitohormonów, ale także inne cząsteczki sygnałowe, które do hormonów roślinnych nie są zaliczane, pełnią specyficzne funkcje w kolejnych etapach ksylogenezy. Udział tych substancji w kontroli rozwoju drewna zaprezentowano poniżej (Tab.1).

Cały proces ksylogenezy – a więc zmiany na etapie różnicowania komórek kambium, utrzymanie tożsamości merystematycznej komórek dzielących się, etapy dyferencjacji komórek wiązek przewodzących, tworzenie wtórnej ściany komórkowej i programowana śmierć komórki, wymagają istotnych modyfikacji aktywności transkrypcyjnej licznych genów. Dzięki profilowaniu ekspresji genów oraz sekwencjonowaniu i bogatym w informacje bankom sekwencji EST, coraz częściej dla badanych przemian komórkowych określić można pulę genów wykazujących różnicową ekspresję, specyficzną dla określonego procesu. W wielu przypadkach zmieniające się wzorce rozwoju wymuszają modulacje aktywności setek a nawet tysięcy genów. Jedynie część z nich koduje czynniki transkrypcyjne, których zadaniem jest kontrola nad pozostałymi. Większość z kodowanych przez geny białek to enzymy oraz białka strukturalne lub sygnałowe decydujące

o zakresie, kierunku i przebiegu zmian metabolicznych charakterystycznych dla aktualnego stanu fizjologicznego komórki.

Badania wykonane na *A. thaliana* i innych gatunkach roślin doprowadziły do identyfikacji kluczowych dla prawidłowego przebiegu ksylogenezy czynników transkrypcyjnych. Okazało się, że należą one do kilku rodzin białek. Najlepiej poznane z nich to czynniki HD-ZIP klasy III, KANADI, NAC czy MYB. Wydaje się, że to one odpowiedzialne są za zmiany ekspresji dużych grup genów

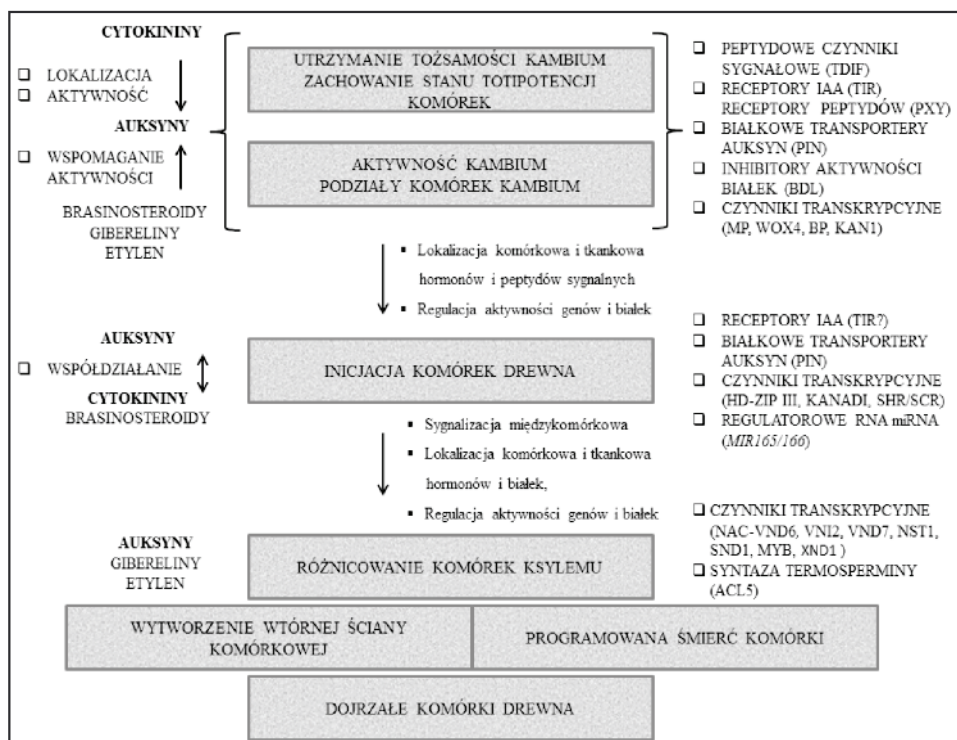
Tab. 2. Zestawienie czynników transkrypcyjnych (TF) zidentyfikowanych w wyniku profilowania aktywności transkrypcyjnej genów u roślin zielnych oraz drzew. Na podstawie Demura i Fukuda [2007]

Gatunek	Tkanka	Liczba genów o zmiennej aktywności	Liczba TF o wyższej aktywności	Rodzina TF
<i>Populus sp.</i>	Rozwijające się /rosnące drewno	539	5	HD-ZIPIII, MYB
	Drewno reakcyjne	444	16	Zinc finger, WRKY, LIM
<i>Loblolly pine</i>	Drewno	1139	19	DNA/RNA binding, Hap5a
<i>Eucalyptus sp.</i>	Drewno	182	7	HD, bZIP, Zinc finger
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drewno pędu	319	33	HD-ZIPIII, NAC, MYB, bHLH, WRKY
	Pęd kwiatostanowy	>3000	191	AP2/EREBP, MYB, bZIP, HD, C3H
	Drewniejące i dojrzałe pędy	700	39	MYB, AP2/ERF, WRKY, NAC, HD, AUX/IAA, ARF
	Rozwijające się pędy	567	76	Zinc finger, HD, AP2, MYC, NAC, MYB
	Różnicujące się naczynia	1705	20	NAC, MYB, bHLH, HD, Zinc finger
<i>Zinnia elegans</i>	Różnicujące się naczynia	652	4	ARF, HDZIPIII, AUX/IAA, NAC
	Różnicujące się naczynia	523	3	NAC, ARF, HDZIPIII

Źródło: Opracowanie własne.

i determinują większość przemian w procesie różnicowania i rozwoju drewna. Analizy porównawcze potwierdziły, że u innych gatunków roślin, w tym u drzew, ksylogeneza podlega regulacji przez homologi i ortologi genów zidentyfikowanych u rzodkiewnika (Tab.2).

Jak widać z Tab. 2 ilość zidentyfikowanych u *Arabidopsis thaliana* genów o różnicowej ekspresji jest znacząco większa niż u pozostałych gatunków roślin. Jest tak ponieważ dzięki całkowitemu zsekwencjonowaniu genomu tej rośliny można dokładnie poznawać geny, a przez nie białka, zaangażowane w proces tworzenia drewna. Wszystko wskazuje, że podobna sytuacja istnieje u drzew i nadzieją na dalszy postęp w tym zakresie są będące na ukończeniu duże projekty sekwencjonowania genomów np. u topoli. Z opisu przemian zachodzących w procesie ksylogenezy widać wyraźnie, jak wiele czynników w nim uczestniczy, i jak skomplikowane są sieci zależności między nimi (Ryc.3).



Ryc. 3. Zestawienie czynników natury hormonalnej oraz białkowej i peptydowej kontrolujących kolejne etapy rozwoju drewna. Po lewej stronie schematu wskazano fitohormony, po prawej peptydy oraz rodziny białek o specyficznych funkcjach (w nawiasach zaprezentowano przykładowe białka, uczestniczące w kontroli ksylogenezy). Czcionką pogrubioną zaznaczono hormony kluczowe dla każdego z etapów powstawania drewna. Pomiędzy schematycznie zaznaczonymi etapami ksylogenezy, oraz wykazem fitohormonów wskazano przykładowe mechanizmy uczestniczące w tych przemianach
Źródło: Opracowanie własne.

Stąd należy przypuszczać, że upłynie kolejnych kilka lub kilkanaście lat zanim zrozumiemy w pełni zmiany zachodzące i poznamy wszystkie determinujące je przyczyny. Niemniej jednak, z całą pewnością, już teraz możliwym staje się modulowanie na poziomie molekularnym poszczególnych etapów różnicowania i rozwoju drewna.

LITERATURA

- Aloni R. 1991. Wood formation in deciduous hard-wood trees (W): Raghavendire A.S. (ed.) Physiology of trees, John Wiley
- Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K (2002) Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J* 32: 401–408
- Baba K, Karlberg A, Schmidt J, Schrader J, Hvidsten TR, Bako L, Bhalerao RP (2011) Activity-dormancy transition in the cambial meristem involves stage-specific modulation of auxin response in hybrid aspen. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3418–3423.
- Bhalerao RP, Bennett MJ (2003) The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* 5:939–943.
- Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, Benková E, Mähönen AP, Helariutta Y (2011) A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Curr Biol* 21:917–926.
- Björklund S, Antti H, Uddestrand I, Moritz T, Sundberg B (2007) Crosstalk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* 52:499–511
- Blake C. Meyers, David W. Galbraith, Timothy Nelson, Vikas Agrawal (2004) Methods for Transcriptional Profiling in Plants. *Be Fruitful and Replicate Plant Physiology* June, Vol. 135, pp. 637–652
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23–39
- Caño-Delgado A, Lee JY, Demura T (2010) Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:605–637
- Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, Cheng JC, Nam KH, Li J, Chory J (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 131:5341–5351 *Nat Cell Biol* 13:611–615.
- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465:316–321.
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999) *Arabidopsis dwarf1* is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 119:897–907.
- Cui X, Ge C, Wang R, Wang H, Chen W, Fu Z, Jiang X, Li J, Wang Y (2010) The BUD2 mutation affects plant architecture through altering cytokinin and auxin responses in *Arabidopsis*. *Cell Res* 20:576–586.
- Demura T, Fukuda H (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci* 12:64–70.
- Du J, Mansfield SD, Groover AT (2009) The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates

- cell differentiation during secondary growth. *Plant J* 60:1000-1014.
- Elo A, Immanen J, Nieminen K, Helariutta Y (2009) Stem cell function during plant vascular development. *Semin Cell Dev Biol* 20:1097-1106
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13:1768-1774
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol* 18:784-788.
- Etchells JP, Turner SR (2010) The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development* 137:767-774.
- Fisher K, Turner S (2007) PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol* 17:1061-1066.
- Fukuda H (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:379-391.
- Fukuda H, Hirakawa Y, Sawa S (2007) Peptide signaling in vascular development. *Curr Opin Plant Biol* 10:477-482.
- Hejátko J, Ryu H, Kim GT, Dobesová R, Choi S, Choi SM, Soucek P, Horák J, Pekárová B, Palme K, Brzobohaty B, Hwang I (2009) The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in Arabidopsis shoots. *Plant Cell* 21:2008-2021
- Hejnowicz Z. 2002. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Wydawn. Nauk. PWN, Warszawa
- Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H (2010) TDIF peptide signalling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 22:2618-2629.
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y, Fukuda H (2008) Non cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15208-15213.
- Ilegems M, Douet V, Meylan-Bettex M, Uyttewaal M, Brand L, Bowman JL, Stieger PA (2010) Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* 137:975-984.
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H (2006) Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* 313:842-845.
- Izhaki A, Bowman JL (2007) KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:495-508.
- Ji J, Strable J, Shimizu R, Koenig D, Sinha N, Scanlon MJ (2010) WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol* 152:1346-1356.
- Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS (2001) KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* 411:706-709.
- Kieber JJ, Schaller GE (2010) The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiol* 154:487-492.
- Ko JH, Prassinis C, Han KH (2006) Developmental and seasonal expression of PtaHB1, a Populus gene encoding a class III HDZip protein, is closely associated with secondary growth and inversely correlated with the level of microRNA (miR166). *New Phytol* 169:469-478
- Kopcewicz J. 2012. Podstawy biologii roślin. Wydawn. Nauk. PWN, Warszawa
- Kopcewicz J., Szmids-Jaworska A., Kannenberg K. 2012. Zarys struktury i fizjologii drzew

- leśnych. Wydawn. WSZŚ w Tucholi, Wydawn. Nauk. UMK w Toruniu
- Lau S, De Smet I, Kolb M, Meinhardt H, Jürgens G (2011) Auxin triggers a genetic switch. *Nat Cell Biol* 13(5):611-5
- Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2738–2753.
- Love J, Björklund S, Vahala J, Hertzberg M, Kanagasjärvi J, Sundberg B (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5984–5989.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 311:94–98.
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita- Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20027-20031
- Mauriat M, Moritz T (2009) Analyses of GA20ox- and GID1-overexpressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J* 58:989-1003
- Mauriat M, Sandberg LG, Moritz T (2011) Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxindependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *Plant J* 67:805–816.
- McCarthy RL, Zhong R, Fowler S, Lyskowski D, Piyasena H, Carleton K, Spicer C, Ye ZH (2010) The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 51:1084-1090
- McCarthy RL, Zhong R, Ye Z-H (2009) MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 50:1950-1964
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK (2001) Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411:709-713
- McHale, N.A. and Koning, R.E. (2004) MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana glauca* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell* 16, 1730–1740
- Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S (2003) The knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev* 17:2088-2093.
- Miyashima S, Koi S, Hashimoto T, Nakajima K (2011) Non-cellautonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development* 138:2303–2313.
- Muñiz L, Minguet EG, Singh SK, Pesquet E, Vera-Sirera F, Moreau-Courtois CL, Carbonell J, Blázquez MA, Tuominen H (2008) ACAULIS5 controls *Arabidopsis* xylem specification through the prevention of premature cell death. *Development* 135:2573-2582
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413:307–311.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20032-20037
- Nilsson J, Karlberg A, Antti H, Lopez-Vernaza M, Mellerowicz E, Perrot-Rechenmann C, Sandberg G, Bhalerao RP (2008) Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell* 20:843-855

- Ohashi-Ito K, Kubo M, Demura T, Fukuda H (2005) Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol* 46:1646–1656.
- Pesquet E, Tuominen H (2011) Ethylene stimulates tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cell cultures. *New Phytol* 190:138–149.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446:811–814.
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, Berglund A, Nilsson P, Hertzberg M, Göran Sandberg G (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* 16:2278–2292.
- Sorce C, Giovannelli A, Sebastiani L, Anfodillo T (2013) Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep* 32:885–898.
- Stahl Y, Wink R, Ingram GC, Simon R (2009) A signalling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* 19:909–914.
- Tomanek J., Witkowska-Żuk L. 2008. Botanika leśna. PWRiL, Warszawa
- Uggla C, Mellerowicz EJ, Sundberg B (1998) Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. *Plant Physiol* 117:113–121.
- Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C (2011) Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:2184–2195.
- Zhao C, Avci U, Grant EH, Haigler CH, Beers EP (2008) XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *Plant J* 53:425–436
- Zhong R, Lee C, Ye Z-H (2010) Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. *Plant Physiol* 152:1044–1055
- Zhong R, Richardson EA, Ye Z-H (2007) The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2776–2792
- Zhong R, Ye ZH (2007) Regulation of HD-ZIP III genes by microRNA 165. *Plant Signal Behav* 2:351–353

STRESZCZENIE

Proces ksylogenezy jest wieloetapowym ciągiem zdarzeń prowadzącym w konsekwencji do wytworzenia charakterystycznego oraz wysoce wyspecjalizowanego rodzaju tkanki przewodzącej. Pomimo, że największe znaczenia gospodarcze mają przemiany zachodzące u drzew postępowo w ich rozumieniu dokonał się dzięki zastosowaniu w badaniach roślin zielnych, zwłaszcza *A. thaliana* i *Z. elegans*. Na podstawie szczegółowych analiz i zastosowania najnowszych technik biologii molekularnej i biotechnologii wyróżniono cztery zasadnicze etapy ksylogenezy: powstawanie aktywnego kambium, inicjacja komórek wytworzonych przez kambium, przekształcenie się ich w komórki prekursorowe drewna, formowanie się grubych wtórnych ścian komórkowych (SCW) i programowana śmierć komórek (PCD). Przebieg każdego z nich kontrolowany jest precyzyjnie przez fitohormony. Wywierają one bezpośredni lub pośredni wpływ na zmiany aktywności transkrypcyjnej licznych genów podlegających jednocześnie kontroli przez inne geny odpowiedzialne tak za ich biosyntezę jak i funkcjonowanie regulatorowych, hormonalnych szlaków transdukcji sygnału. Wykazano, że najważniejsze dla tworzenia drewna są auksyny i cytokiny, a ich współdziałanie decyduje o aktywności kambium, utrzymywaniu puli komórek nieodróżnionych oraz o różnicowaniu elementów

trachealnych. Wpływ na tak wiele etapów sugeruje udział auksyn i cytokinin w globalnej kontroli ksylogenezy. Pozostałe fitohormony, gibereliny, brasinosteroid czy etylen włączane są w bardziej subtelne przemiany. Niemniej wydaje się, że i one mogą pełnić pomocniczą rolę towarzyszącą w tych zasadniczych etapach powstawania i różnicowania drewna. Wpływ wszystkich fitohormonów manifestuje się zmianami ekspresji swoistych genów. Jedynie część z nich koduje białka regulatorowe będące czynnikami transkrypcyjnymi. Należą one do kilku klas m.in. HD-ZIP, ARF, MYB, NAC, kontrolujących ekspresję całego szeregu genów istotnych dla całości przemian na drodze ksylogenezy. Warto nadmienić, że część z nich to białka decydujące o biosyntezie hormonów i ich funkcjonowaniu w komórkach drewna. Świadczy to o nierozzerwalności układu fitohormonalnego i aktywności genomu, a wzajemne zależności między nimi pozwalają niezwykle precyzyjnie określać funkcje i kierunek rozwoju komórek drewna. Badania prowadzone na drzewach wykazały, że mechanizmy ksylogenezy w znacznej części pokrywają się z opisanymi u *Arabidopsis*. Wymagane są oczywiście dalsze, bardziej szczegółowe analizy niemniej jednak stwierdzić można, że podstawy powstawania drewna są zachowywane ewolucyjnie i przebiegają w podobny sposób u różnych gatunków roślin.

SUMMARY

Xylogenesis is a multi-stage sequence of metabolic events leading to the formation of a characteristic and highly-specialized type of vascular tissue. Although xylogenesis occurring in trees has the largest economic significance, the progress in their understanding was made through the research on herbaceous plants, particularly *A. thaliana* and *Z. elegans*. Based on the detailed analyses and using modern molecular biology and biotechnology techniques, four major xylogenesis stages were distinguished: formation of active cambium, specialization of cells formed by the cambium, their transformation into precursor cells of the wood, formation of thick secondary cell walls (SCW) and programmed cell death (PCD). The progress of each of them is controlled precisely by phytohormones. They exert direct or indirect effects on the changes in the transcriptional activity of numerous genes and, at the same time, are controlled by other genes responsible both for their biosynthesis and the functioning of regulatory hormone transduction pathways. It was shown that the main role in wood formation is played by auxins and cytokines, while their interactions have a decisive impact on cambium activity, maintaining of pools of non-differentiated cells, and the tracheary element differentiation. The fact that auxins and cytokines have influence on such a large number of stages suggests that they participate in the global control of xylogenesis. The rest of the phytohormones - gibberellins, brassinosteroids or ethylene are involved in more subtle transformations. Nevertheless, it appears that they also play an essential role in wood formation and differentiation. The effects exerted by all the phytohormones are manifested through the changes in the expression of specific genes. Only some of them encode regulatory proteins that are transcription factors. They belong to several classes, among them HD-ZIP, AFR, MYB, NAC, which control the expression of a whole array of genes crucial for all transformations related to xylogenesis. It needs to be mentioned that some of those proteins determine the biosynthesis of hormones and their functions in the wood cells. This proves that the link between the functioning of the phytohormonal system and the genomic activity is unbreakable, and their mutual relationships allow for a precise description of the functions and directions of development of the wood cells. The research on trees showed that the mechanisms of xylogenesis overlap to a large extent those described for *Arabidopsis*. Obviously, further and more detailed analyses are required, although it can already be stated that the foundations of the mechanisms for the formation of the wood are evolutionarily conserved and are similar across different plant species.