

Postęp badań fizjologicznych i genetycznych w zakresie reakcji drzew leśnych na niskie temperatury

Progress in physiological and genetic research concerning forest tree response to low temperature

Maria Novokreshchenova*, Katarzyna Skowrya, Marta Kempf 

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, Wydział Leśny, Instytut Ekologii i Hodowli Lasu, Zakład Genetyki, Nasiennictwa i Szkółkarstwa Leśnego, al. 29 Listopada 46, 31-425 Kraków, Polska

*Tel. +48 12 6625124, e-mail: maria.novokreshchenova@urk.edu.pl

Abstract. Forest trees are a great model for physiological and genetic studies of plant resistance to unfavorable environmental conditions, since the same species can successfully acclimate at different latitudes. Modern biology, such as genomics, transcriptomics, proteomics, etc., significantly facilitates these studies and accelerates the acquisition of new knowledge. This allows for a more effective implementation of conservation measures and the renewal of forest ecosystems.

This review contains information on the latest scientific achievements in the field of acclimatization and tolerance to abiotic stresses, such as cold and frost, of forest trees. There is no doubt that in the course of evolution forest trees developed a complex and dynamic mechanism for controlling the entry into the winter dormancy stage, which allows woody plants to successfully survive in cold and freezing conditions and is initiated long before the beginning of winter. Studying the function of individual genes in forest tree species, however, remains an incredibly difficult task due to large genomes, specific development as well as the lack of standard techniques and routine procedures. In recent years, similarities between the well-studied genetic response to low temperatures of the model plant *Arabidopsis thaliana* and forest trees have been identified, which produced meaningful analogies and allows for issues of functional genetics to be addressed more effectively.

The main goal of this work was to show that findings from forest tree genomics can be effectively used as a tool for the reproduction and protection of important tree species through the identification of the predisposition of specific populations to climate change and their adaptive capacity.

Keywords: adaptation, tolerance, molecular response to stress, woody plants

Słowa kluczowe: adaptacja, tolerancja, odpowiedź molekularna na stres, drzewa leśne

1. Wstęp

Ekosystemy lasu, w tym drzewa, zioła, mikroorganizmy, zwierzęta itd., pełniąc wiele ważnych funkcji produkcyjnych, ochronnych, społecznych, czy też rekreacyjnych, jednocześnie, poprzez tworzenie specyficznych warunków fitoklimatycznych, odgrywają dużą rolę w łagodzeniu skutków zmian klimatu (Neale, Kremer 2011). Zarówno obecne, jak i przewidywane zjawiska przyrodnicze, takie jak długotrwałe susze lub mrozy, nadmierne zasolenie, czy też powódzie, wpływają negatywnie na wzrost i żywotność drzew, stanowiąc poważne zagrożenie dla produktywności i utrzymania trwałości lasów na całym świecie (Salojärvia et al. 2017). Przewiduje się, że zamieranie drzew w wyniku stresu abiotycznego, w tym oddziaływania niskich temperatur, w kolejnych dekadach będzie coraz szybsze (Harfouche et al. 2014).

W gospodarce leśnej jednym z ważniejszych zjawisk meteorologicznych, które należy brać pod uwagę w praktyce hodowlanej, są przymrozki. Ze względu na ich negatywne znaczenie gospodarcze następuje dynamiczny rozwój prac badawczych związanych z odpornością drzew leśnych na niskie temperatury (LT ang. *low temperature*) (Hurme et al. 2000; Gonzalez-Martinez et al. 2006; Salojärvia et al. 2017).

W charakterystyce przymrozków uwzględnia się nie tylko terminy ich pojawienia się lub zakończenia, ale także czas trwania oraz faktyczną liczbę dni przymrozkowych. Przymrozek występuje wtedy, gdy średnia temperatura dobowa jest wyższa od zera, natomiast temperatura minimalna spada poniżej tej wartości lub, gdy temperatura maksymalna jest wyższa od zera, natomiast minimalna ma wartość ujemną. Przymrozki występujące tuż przy gruncie określa się jako przygruntowe, natomiast notowane w klatce meteorologicz-

Wpłynęło: 4.09.2018 r., zrecenzowano: 12.03.2019 r., zaakceptowano: 10.12.2019 r.

nej określane są jako całkowite. Dla roślin szczególnie niebezpieczne są tzw. przymrozki późne, występujące wiosną, ponieważ rozwijające się w tym czasie pąki liściowe i pędy są bardzo wrażliwe na niskie temperatury. Najbardziej zagrożone przymrozkami są uprawy leśne, młodniki oraz szkółki położone na otwartym terenie, niechronionym przed wypromieniowaniem energii cieplnej (Wilczyński et al. 2005).

Tradycyjne techniki hodowli selekcyjnej mogą skutecznie poprawiać zarówno cechy ilościowe, jak i jakościowe drzew, takie jak np. wysokość drzew, budowa korony, czy też częściowo odporność na stresy biotyczne i abiotyczne. Niestety, ze względu na długi okres życia drzew, wolne zmiany ontogenetyczne, długi okres osiągnięcia dojrzałości, duże rozmiary genomu, a także brak dobrze scharakteryzowanych mutacji, ulepszanie drzew leśnych metodą selekcji jest procesem żmudnym i powolnym (Harfouche et al. 2014).

Drzewa, pomimo szeregu ograniczeń w dynamicznym rozwoju badań nad ich tolerancją na niskie temperatury, stanowią ciekawy obiekt badań. Rośliny drzewiaste w strefie borealnej do Arktyki i wysokich gór mogą przetrwać długotrwałą ekspozycję na temperaturę poniżej 40°C, a nawet -60°C, a testy laboratoryjne wykazały, że wiele z tych gatunków może przetrwać zanurzenie w ciekłym azocie w temperaturze -196°C (Strimbeck et al. 2014). W leśnych regionach tajgi Syberii i Kanady temperatury wahają się od rekordowo niskiego poziomu -64°C do rekordowo wysokiego poziomu +36°C, o łącznej amplitudzie 100°C. Zimą w rejonach tych zimozielone sosny *Pinus*, świerki *Picea*, jodły *Abies*, wraz z modrzewiem *Larix* i kilkoma gatunkami okrytonasiennymi są ekspozowane na ekstremalne zimno, zmienne warunki świetlne oraz na suche i silne wiatry (Strimbeck et al. 2014). Rośliny pochodzące z obszarów borealnych i umiarkowanych charakteryzują się większą zdolnością radzenia sobie z niskimi i mroźnymi temperaturami. W ciągu ostatnich lat możliwości hodowlane niektórych gatunków drzew leśnych zostały rozwinięte, dzięki postępom genetyki i genomiki roślin. Badania gatunków syberyjskich i kanadyjskich, charakteryzujących się pełną tolerancją na ekstremalnie niskie temperatury, wskazują, że tolerancja na LT zmienia się w zależności od klimatu miejsca pochodzenia tych gatunków, co wskazuje, że jest to genetycznie utrwalony wynik adaptacji i podlega on silnej kontroli genetycznej (Strimbeck et al. 2014).

Celem pracy jest przegląd literatury, związanej z genetyką funkcjonalną zjawiska odporności drzew leśnych na niskie temperatury.

2. Odpowiedź fizjologiczna roślin drzewiastych na niskie temperatury (LT)

Tolerancja na zamarzanie drzew ściśle wiąże się fazami cyklu wegetacyjnego i co za tym idzie ich aktywnością fizjologiczną. Działalność merystematyczna pąków wierzchołkowych ustaje w odpowiedzi na skrócenie długości dnia, co kończy się zatrzymaniem wzrostu i rozpoczęciem fazy spoczynkowej. Wyróżnia się spoczynek względny, który jest skutkiem oddziaływania negatywnych czynników zewnętrznych, takich jak niska temperatura czy niedobór tlenu, który ustępuje, gdy warunki się poprawiają. Występuje także zjawisko spoczynku głębokiego roślin,

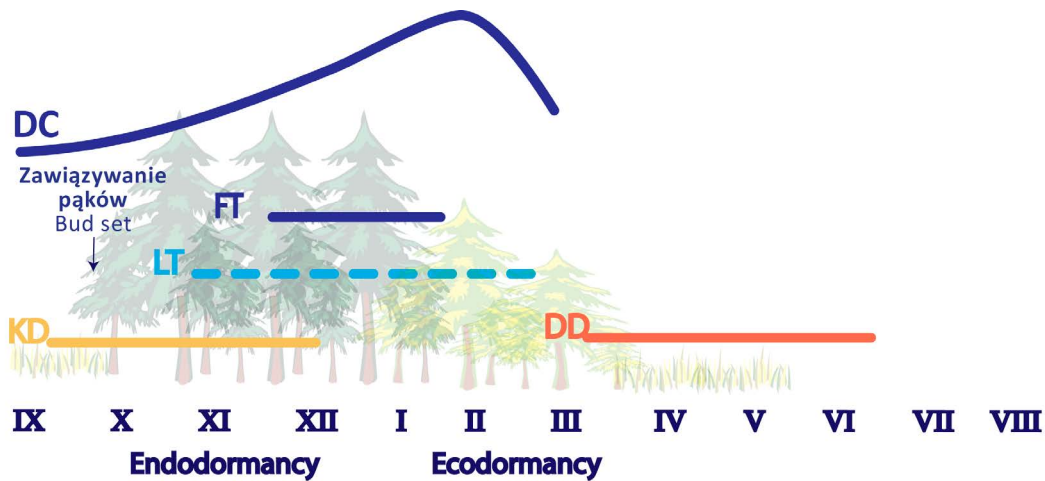
którego przyczyną są zmiany w mechanizmach wewnętrznych rośliny związane z gospodarką hormonalną czy predyspozycjami genetycznymi (Kopcewicz et al. 2012). Kilka tygodni po ustaniu wzrostu pąki wchodzą w stan spoczynku głębokiego. Równoległe do zahamowania wzrostu, w odpowiedzi na fotoperiod krótkiego dnia, tolerancja na zamarzanie drzew zaczyna wzrastać. Przedłużająca się ekspozycja na krótki dzień może prowadzić do znacznego zwiększenia się tolerancji na zamarzanie (ryc. 1) (Welling, Palva 2006).

Większość procesów podtrzymujących życie w roślinie jest zależna od temperatury. Jest to związane z termicznym przystosowaniem się białek enzymatycznych, stadium rozwoju rośliny i jej warunków wzrostu (Floryszczak-Wieczorek 2008). Stres termiczny pojawia się wtedy, gdy roślina jest poddana działaniu temperatury odbiegającej od optymalnej. Na podstawie zdolności przystosowania do temperatury wyróżnia się:

- rośliny, które są wrażliwe na chłód, a ich zakres tolerancji wynosi od +10°C do 0°C; z reguły są to rośliny rosnące w klimacie tropikalnym i subtropikalnym,
- rośliny, które są wrażliwe na mróz, tolerują temperaturę do 0°C; są to rośliny rosnące w strefie umiarkowanej, jednak doznają uszkodzeń, gdy temperatura jest na tyle niska, że powoduje krystalizację wody w komórce roślinnej; do takich roślin należy „drozofila” genetyki roślin – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.,
- rośliny, które tolerują zamarzanie, a ich zakres temperatury wynosi od -1°C do -70°C; z reguły są to drzewa – wieoletnie rośliny lądowe, mchy i glony.

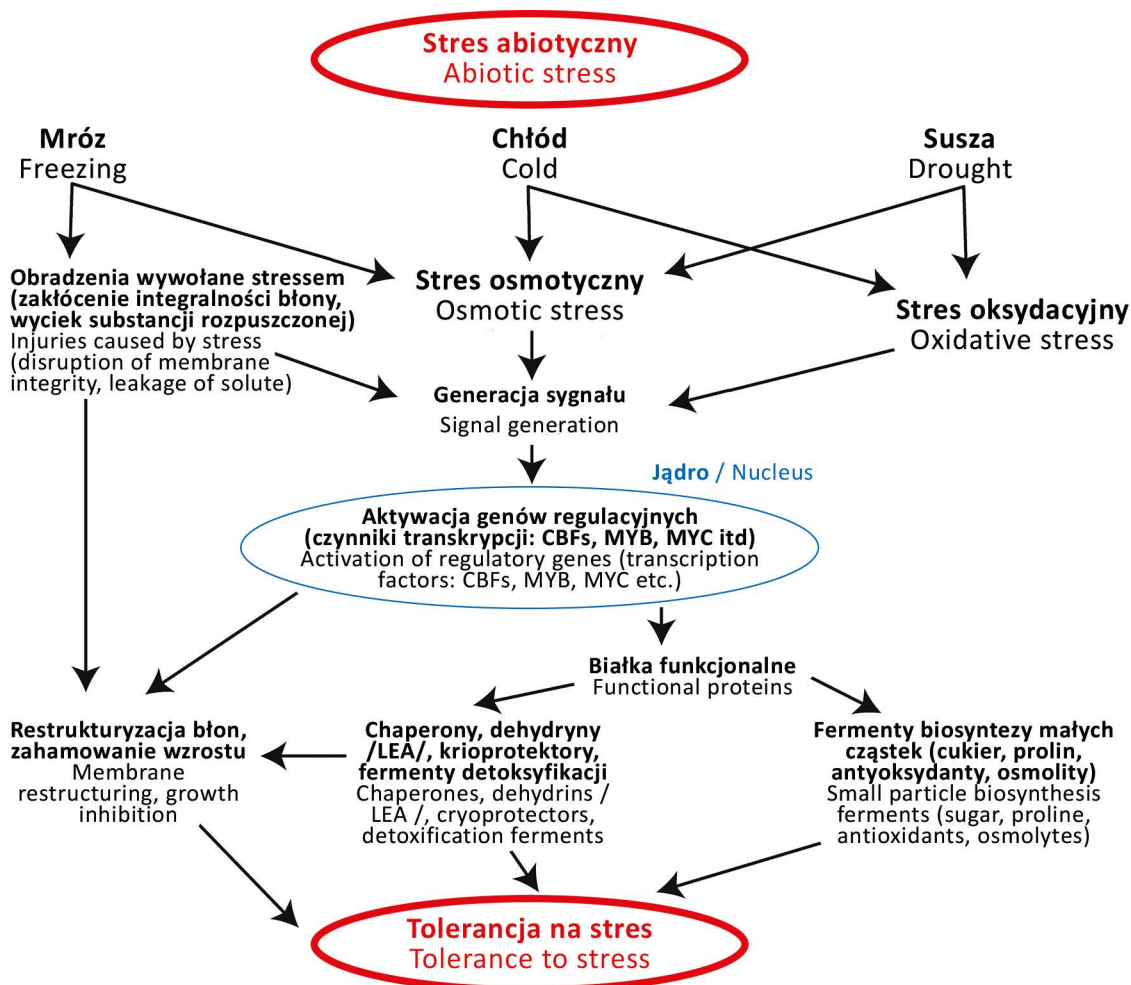
Rośliny tolerujące zamarzanie, szczególnie drzewa, po jesiennym okresie aklimatyzacji są w stanie znieść krystalizację wody poza komórkę i utratę wody przez komórki w czasie zamarzania. Temperaturę krzepnięcia w komórkach obniża zwiększona gęstość cytoplazmy i częściowa utrata wody. Formowanie się kryształków lodu w apoplacie nie jest jeszcze sytuacją krytyczną i nieodwracalną dla komórki. Nieodwracalne uszkodzenia można zaobserwować wtedy, gdy kryształki lodu tworzą się w symplacie. Dlatego też odporność na mróz opiera się głównie na tworzeniu się lodu wewnątrz komórki. Jednym z ważniejszych mechanizmów obronnych jest, tzw. plazmoliza mroźowa, która polega na przenikaniu wody do apoplastu i zapobiega „przechłodzeniu cieczy” (Kopcewicz et al. 2012). Reakcje wywołane przez mróz w dużym stopniu przypominają warunki odpowiadające deficytowi wodnemu. Następnym tego jest zmiana konformacyjna białek oraz nieprawidłowe reakcje pomiędzy ścianą komórkową a jej błoną. Wszystkie te procesy prowadzą do zatrzymania fotosyntezy w roślinie (Floryszczak-Wieczorek 2008).

Mróz powoduje głównie uszkodzenie błony komórkowej poprzez kryształki lodu, co prowadzi do nadmiernego wycieku elektrolitów z tkanek (Tuteja 2009). Kolejną reakcją na chłód jest zjawisko depolaryzacji błon. Następuje otworzenie się kanałów wapniowych, co z kolei powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Dotyczy to także komórek aparatów szparkowych, które otwierając się, powodują szybkie wędniecie rośliny (Floryszczak-Wieczorek 2008). Zasadniczo rośliny rosnące w strefie umiarkowanej są odporne na chłód, jednak są one narażone na działanie mrozu w okresie zimowym i dlatego zmuszone są do wykształcania odpowiednich systemów odpornościowych (ryc. 2).



Rycina 1. Roczny przebieg spoczynku i tolerancji zamarzania dorosłego osobnika brzozy podczas zimowania na terenie Polski. DD – dzień długi, KD – dzień krótki, LT – niska temperatura, FT – temperatura krzepnięcia, cyfry rzymskie oznaczają miesiące, DC – dynamika tolerancji na zamarzanie, zielony kolor roślin w tle – endodormancy (spoczynek bezwzględny), żółty kolor roślin w tle – ecodormancy (spoczynek względny) (Welleng, Palva 2006; adaptacja dla terenów Polski za pomocą <https://www.gismeteo.pl/> i yandex.ru).

Rycina 1. Annual dormancy and freezing tolerance in an adult birch individual during wintering in Poland. DD – long day, KD – short day, LT – low temperature, FT – freezing point temperature. Roman numerals indicate months, DC – dynamics of freezing tolerance, green background color of plants – endodormancy (absolute rest), yellow background color of plants – ecodormancy (relative rest) (Welleng, Palva 2006, adaptation for Poland using <https://www.gismeteo.pl/> and yandex.ru).



Rycina 2. Procesy zachodzące w komórce roślinnej pod wpływem działania stresów abiotycznych
Figure 2. Processes occurring in a plant cell during the abiotic stress response

Najważniejszą rolę w tolerancji na niską temperaturę pełni błona komórkowa. Ze względu na swoje peryferyczne usytuowanie w komórce stanowi ona granicę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a cytoplazmą, bierze udział w gospodarce jonami oraz odpowiada za równowagę wodną. Siła tolerancji w dużej mierze zależy od stabilności błony komórkowej, a także od zdolności adaptacji, na którą mają wpływ takie procesy jak: zmiany we właściwościach membran, poziomu hormonów, zawartości cukrów oraz ekspresji genów. Na przykład, wzrost zawartości kwasu abscysynowego (ABA) w komórkach jest związany z wytrzymałością roślin drzewiastych na chłód i mróz (Rakowski 2005).

3. Molekularna i genetyczna odpowiedź drzew leśnych na LT

Aklimatyzacja roślin do niskiej temperatury to skutek zmian w transkrypcji genów (Kimieć et al. 2005). Stres związany z niską temperaturą powoduje zmiany w metabolizmie komórki poprzez przyspieszenie degradacji białek oraz spowalnianie ich syntezy. Równocześnie powstają nowe białka, nazywane białkami stresowymi (Kopcewicz et al. 2012). Klasyczne badania genetyczne wykazały, że zdolność roślin do aklimatyzacji jest cechą ilościową, obejmującą działanie wielu genów (Tomashow 1999). Jak już

wspomniano, jednym z głównych czynników stresowych w komórkach, wynikającym ze zmiany potencjału wody w komórce, jest odwodnienie wywołane zamarzaniem (Wisniewski et al. 2003). Ponadto indukowana przez zimno produkcja reaktywnych form tlenu, szczególnie w połączeniu z dużą intensywnością światła, przyczynia się do jeszcze większego uszkodzenia błon (Welling, Palva 2006). Dlatego w aklimatyzacji komórek roślinnych do warunków stresu abiotycznego, wywołanego niską temperaturą, bierze udział indukcja genów kontrolujących stabilność błon, biosyntezę białek opiekuńczych, wzmocnienie mechanizmów antyoksydacyjnych oraz gromadzenie cukrów i kompatybilnych substancji rozpuszczonych (Tuteja 2009). Liczne zmiany w ekspresji genów, zachodzące podczas aklimatyzacji do warunków zimna (tab. 1), wykazała, technologia mikromacierzy (od ang. Microarray), umożliwiająca badanie ekspresji tysięcy genów jednocześnie (Fowler, Tomashow 2002; Seki et al. 2002).

Generalnie geny reagujące na stres można podzielić na dwie grupy: geny, które bezpośrednio uczestniczą w ochronie komórek w warunkach stresowych oraz geny kodujące składniki szlaku przekazywania sygnału, które regulują ekspresję genów w odpowiedzi na stres (Tomashow 1999). Nowe narzędzia genomiki funkcjonalnej, szeroko wykorzystywane w badaniach aklimatyzacji do niskich temperatur

Tabela 1. Badanie genomiki funkcjonalnej w roślinach drzewiastych odnośnie zimowania (Welling, Palva 2006 z modyfikacjami)
Table 1. The study of functional genomics in woody plants regarding wintering (Welling, Palva 2006 with modifications)

| Metoda Method | Liczba EST/genów/i część rośliny Number of ESTs/genes/and part of the plant | Warunki, jeśli określono Treatment(s) if specified | Gatunki Species | Odniesienie Reference |
|--|--|---|---|---|
| Sekwencjonowanie EST EST sequencing | sekwencje EST 4406 i 3649 z aktywnego (4406) i uśpionego (3649) kambium 4406 and 3649 EST sequences from active and dormant cambium, respectively | lato/jesień (aktywny wzrost/wchodzenie w stan spoczynku summer/autumn (active growth/dormancy) | topola osika poplar <i>Populus tremula</i> L. | Schrader et al. (2004) |
| Sekwencjonowanie EST EST sequencing | 17 500 unigenów 17,500 unigenes | 12 różnych bibliotek 12 different libraries | brzoza brodawkowata birch <i>Betula pendula</i> Roth. | K. Ojala et al. (dane nieopublikowane / unpublished data) |
| Microarray | 2171 EST z ksylemu i merystemu wierzchołkowego 2171 ESTs from xylem and shoot tip library | sezonowe zmiany w drewnie wczesnym i późnym seasonal changes in earlywood-latewood | sosna taeda loblolly pine <i>Pinus taeda</i> L. | Yang, Loopstra (2005) |
| Microarray | 21 840 unigenów z igieł z górnych płatów bocznych w bieżącym roku 21,840 unigenes from needles from the upper lateral lobes this year | lato/jesień (wczesna zima) summer/autumn (early winter) | świerk sitkajski sitka spruce <i>Picea sitchensis</i> (Bong.) Carrière | Holliday et al. (2007) |
| Microarray | 7254 unigenów 7254 unigenes | pędy zbierano co cztery godziny przez dwa dni w zimie i w lecie shoots were collected every four hours for two days in winter and summer | kryptomeria japońska cryptomeria japonese <i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D. Don | Nose, Watanabe (2014) |

roślin zielnych, zastosowano także w badaniach nad wchodzeniem drzew w stan spoczynku i rozwojem tolerancji na mróz. Obejmują one analizę transkryptomu i proteomu aklimatyzujących się gatunków drzewiastych na podstawie analizy sekwencji metodą EST (ang. *Expressed Sequence Tag*). Metodę tę zastosowano do znalezienia kilkuset unikalnych transkryptów dla aklimatyzujących się do zimna gatunków, np. borówek *Vaccinium* spp., brzozy *Betula* spp. oraz topoli *Populus* spp. Jest ona szczególnie użyteczna w przypadku gatunków, których genom jeszcze nie jest znany, jednocześnie ujawniając nowe geny mogące być związane z aklimatyzacją do zimna i dając przybliżony obraz ekspresji genów (Welling, Palva 2006).

Rozwój badań genetyki funkcjonalnej drzew leśnych następuje w odpowiedzi na ciągłą potrzebę opracowywania nowych i doskonalenia istniejących narzędzi ochrony i gospodarki populacjami leśnymi. Jednym z głównych celów jest wypracowanie mechanizmów wspierających prowadzenie zrównoważonej gospodarki leśnej. Z jednej strony, działania te bazują na propagowaniu i wzbogacaniu istniejącej w lasach różnorodności genetycznej. Cel ten zostanie osiągnięty dzięki zrozumieniu ewolucji i rozwojowi możliwości adaptacyjnych w kontekście ewolucyjnym i ekologicznym (Neale, Kremer 2011). Z drugiej strony, wspierają one także hodowlę selekcyjną drzew leśnych oraz dążenie do zapewnienia właściwego, pod względem jakościowym i ilościowym, leśnego materiału podstawowego. Selekcyjne i genetyczne doskonalenie gatunków, zwłaszcza tych posiadających krótki cykl produkcyjny, ma zapewnić zrównoważoną dostawę surowca drzewnego na potrzeby sektora przetwórstwa drzewnego.

Wśród drzew, w odróżnieniu od roślin zielnych, nie istnieje jeden uniwersalny gatunek modelowy oraz nie ma gatunku ekonomicznie dominującego nad innymi gatunkami na świecie. Ta sytuacja z pewnością utrudnia postęp, ale w związku z rozwojem technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS – ang. *Next Generation Sequencing*), duża liczba gatunków docelowych, niejednokrotnie o wysokim zróżnicowaniu genetycznym, stanie się impulsem do rozwoju genomiki strukturalnej i funkcjonalnej. Sekwencjonowanie genomów gatunków głównych pozwoli tworzyć próby referencyjne dla tysięcy sekwencji gatunków o mniejszym znaczeniu gospodarczym: pielęgnacyjnych i biocenotycznych (Neale, Kremer 2011). W badaniach mrozoodporności drzew leśnych obiecującym obiektem, który może pełnić rolę drzewa modelowego, jest brzoza brodawkowata *Betula pendula* Roth. Ma ona północny zasięg występowania, krótki cykl życia (inicjacja kwitnienia w ciągu 1 roku), a co najważniejsze, posiada krótki, zsekwencjonowany genom (440-Mb) (Salojärva et al. 2017).

Aby efektywnie wykorzystać wyniki analiz molekularnych i genetycznych w celu poprawy odporności drzew na stres wywołany przez czynniki abiotyczne konieczne jest szczegółowe zrozumienie szlaków sygnałowych roślin, a także poznanie genów kodujących i regulujących syntezę kluczowych białek. Zrozumienie molekularnych i genetycznych podstaw ekspresji cech poligenicznych jest ważną kwe-

stią w poprawie jakości drzew, a także wiąże się z wieloma innymi dziedzinami. Nowsze technologie takie jak selekcja genomowa (GS – ang. *Genomic Selection*) i EcoTILLING dostarczają obecnie nowych sposobów na poszerzenie wiedzy na temat różnych procesów zachodzących w drzewach leśnych i roli jaką pełnią kluczowe geny (Harfouche et al. 2014). Poznanie i rozszyfrowanie sposobu przystosowania się drzew leśnych do trudnych warunków środowiska, zwłaszcza w obliczu prognozowanych zmian klimatu, będzie w przyszłości ogromnym ułatwieniem w spełnianiu postulatów zrównoważonej gospodarki leśnej modelu wielofunkcyjnego, zakładającego współistnienie funkcji produkcyjnych, przy jednoczesnym zapewnieniu ciągłości i trwałości lasów dla przyszłych pokoleń.

3.1. Czynniki transkrypcji CBF (*C-repeat Binding Factors*)

Jedną z najważniejszych ścieżek regulacyjnych procesu aklimatyzacji do warunków zimna jest szlak odpowiedzi CBF/DREB1, który został szeroko scharakteryzowany dla *Arabidopsis thaliana*. Genom *Arabidopsis* koduje małą grupę czynników transkrypcyjnych znanych jako CBF1-3 lub odpowiednio DREB1 A-C (Kurbidaeva, Novokreshchenova 2011). Białka te posiadają domenę wiążącą DNA, bardzo podobne sekwencje aminokwasowe oraz kodowane są przez geny znajdujące się na 4 chromosomie (kolejno: AT4G25490, AT4G25470, AT4G25480) (Kmieć et al. 2005). Indukcja genów CBF1-3 następuje w ciągu 10–15 minut od ekspozycji rośliny na działanie niskiej temperatury. Maksymalna ekspresja zostaje osiągnięta w przeciągu 2–3 godzin i ustaje po 24 godzinach (Gilmour et al. 2004). W czasie gromadzenia się transkryptów DREB1, w promotorach następuje akumulacja mRNA odpowiednich genów z motywem CRT/DRE (ang. *C-repeat/dehydration response element*), który jest regulatorem sekwencją DNA genów kodujących białka ochronne przed stresem. Geny są indukowane przez czynnik nazywany „CBF regulon”. Udowodniono, że zawiera on 109 genów należących do kilku grup (Fowler, Thomashow 2002). Udział czynnika „CBF regulon” w aklimatyzacji do niskich temperatur wykazano w badaniach, w których nadekspresja CBFs prowadzi do konstytutywnej ekspresji genów docelowych CBF, co skutkuje nie tylko zwiększoną tolerancją na zamarzanie roślin, ale także zwiększoną odpornością na suszę i sól (Kasuga et al. 1999; Gilmour et al. 2004). Rodzinę białek CBF, konserwatywną wśród gatunków roślin zielnych, znaleziono nawet w roślinach niezdolnych do aklimatyzacji, takich jak pomidory i ryż (Thomashow 1999).

Ostatnie badania molekularne i genetyczne wyraźnie wykazują jednak, że obniżenie temperatury prowadzi do aktywacji podobnego procesu przekazu sygnałów i ekspresji genów ortologicznych zarówno u roślin zielnych, jak i drzewiastych. Benedict i in. (2006) sklonowali z *Populus balsamifera* L. ortologów genów rodziny CBF *Arabidopsis thaliana* (AtCBFs). Badania nad ekspresją genów AtCBFs topoli wykazały ich zdolność do przenoszenia zwiększonej tolerancji

na niską temperaturę i inne stresy abiotyczne. Eksperymenty z mikromacierzami cDNA pozwoliły zidentyfikować geny zwiększające swoją ekspresję przez nadekspresję *AtCBF1* u tego gatunku. Wykazano silne podobieństwo regulonu CBF pomiędzy topolą a rzodkiewnikiem oraz zidentyfikowano różnice pomiędzy regulonami liści i pędów. Dzięki temu Benedict i in. (2006) byli w stanie wykazać, że regulacja genów dotkniętych przemrożeniem liści topoli typu dzikiego była podobna do topoli z genem transgenicznym *AtCBF*. Jednak zróżnicowana ekspresja paralogów *PtCBF* i różnych grup genów reagujących na CBFs w tkankach czasowych (liściach) i stałych (łodygach) sugeruje, że w wyniku ewolucji spoczynku zimowego u roślin wieloletnich, rola tych genów w różnych tkankach gatunków drzewiastych może być odmienna.

3.2. Dehidryny

W badaniach nad aklimatyzacją do warunków zimna, najszerszej analizowanymi białkami są dehidryny, ze względu na swoją obfitość i przewidywaną rolę w ochronie komórek przed odwodnieniem. Kilka genów dehidrynowych w swoim promotorze zawiera LTRE/DRE/CRT (element reakcji na niską temperaturę i suszę) (Welling, Pavla 2006), który jest rozpoznawalny przez czynniki transkrypcyjne CBF. Ponadto niektóre dehidryny gromadzą się w odpowiedzi na ABA, którego poziom wzrasta w wyniku stresu osmotycznego, w tym mróz (Kurbidaeva, Novokreshchenova 2011). Do tej pory zidentyfikowano w transkryptomie *Pinus massoniana* Lamb. ortologiczne geny uczestników odpowiedzi na kwas abscysynowy (NCED, *PYL* i td.) oraz dezaktywację reaktywnych form tlenu (GPX, GST i GSR) (Du et al. 2018). W ostatnich latach aktywnie badano fizjologiczną rolę dehidryn związanych z adaptacją, i chociaż dokładnej funkcji większości dehidryn nie wyjaśniono do tej pory, to stwierdzono, że mają one strukturę hydrofilową, która determinuje funkcję wiązania wody w komórce i zapobiega tworzeniu się kryształów lodu (Graether, Boddington 2014).

Badania wykazały sezonową zmienność ekspresji genów dehidrynowych i zawartość białek w różnych roślinach drzewiastych. Poziom ten jest wysoki w zimie i niski w okresie aktywnego wzrostu (Welling, Pavla 2006). Aby przeanalizować czynniki regulujące pojawienie się dehidryn podczas zimowania, zbadano ekspresje genów na różne warunki środowiskowe. Większość dehidryn w tkankach roślin drzewiastych jest indukowana w odpowiedzi na LT lub pod wpływem skrócenia pory dnia, a następnie LT (Cooke et al. 2012). Dodatkowo wykazano, że dehidryny są indukowane w tkance uśpionej w odpowiedzi na temperaturę krzepnięcia, jednak tylko po rozmrożeniu tkanki (Welling, Pavla 2006). W komórkach brzozy *Betula* spp. dehidryny wyraźnie ulegały ekspresji jesienią w odpowiedzi na krótki dzień oraz w środku zimy w odpowiedzi na niską temperaturę oraz mrozy (Welling, Pavla 2006).

Drzewa po aktywnym okresie wzrostu na początku lata zaczynają przygotowywać się do zimy długo przed nieko-

rzystnymi warunkami (Welling, Pavla 2006). Schrader i in. (2004) stosowali metodę kriosekcji w celu wyizolowania oczyszczonych kambialnych komórek merystemu z rośliny drzewiastej *Populus tremula* podczas aktywnego wzrostu i spoczynku. Wykazali oni, że geny z rodziny *PttCBFs*, tak samo jak geny z rodziny *PttLEA* (Late Embryodensis Abundant, dehidryny), ulegają większej ekspresji w merystemach topoli uprawianych w warunkach polowych w odpowiedzi na krótki dzień, który może pośrednio wpłynąć na ekspresję genów mrozoodporności w trakcie aklimatyzacji. Jak sugeruje Puhakainen i in. (2004) krótki dzień ma także bezpośredni wpływ na geny indukowane przez niską temperaturę. Wykazano, że nasila on indukcję genów dehidrynowych brzozy, pozostających pod kontrolą CBF (Puhakainen et al. 2004). To zagadnienie było szeroko analizowane na przykładzie modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*, dla której wykazano, że ekspresja genu *CBF1* jest uzależniona od rytmów dobowych (Lee, Thomashow 2012).

Przykładem aktualnych tendencji i szybkiego postępu w badaniach z zakresu genomiki funkcjonalnej w leśnictwie jest sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L. Gatunek, który pomimo ważnej roli ekologicznej i gospodarczej, oraz rozległego zasięgu występowania w Europie i Azji (Wachowiak et al. 2014), z racji olbrzymiego genomu, przez lata pozostawał poza orbitą możliwości badawczych. Ostatnio, dzięki szybkiemu rozwojowi technologii, możliwe było zmieniienie nukleotydu w haplotypach w kilku genach-kandydatach odpowiedzi na LT w wybranych, wykazujących rozbieżność w zakresie tolerancji na zimno, europejskich populacjach sosny zwyczajnej. Wykryto znaczne zróżnicowanie w strukturze częstotliwości allelicznej haplotypów w siedmiu miejscach rodziny genów dehidrynowych, w tym *dhn1* i *dhn3* (Wachowiak et al. 2009), oraz *abaR* (ang. *abscisic acid-responsive protein*), który jest ortologiem genu *AtGUN5*. Jego produkt był zidentyfikowany jako potencjalny składnik biorący udział w odbiorze sygnału pomiędzy chloroplastem a jądrem komórkowym podczas aklimatyzacji roślin do niskich temperatur (Wachowiak et al. 2009; Kindgren et al. 2015).

4. Podsumowanie

Wysoka zmienność wewnątrzpopulacyjna drzew stwarza doskonałe możliwości do zrozumienia molekularnych podstaw funkcjonowania organizmów roślinnych (Neale et al. 2013), w tym do ich reakcji na zmiany warunków środowiskowych. Poznanie funkcji poszczególnych genów u gatunków drzew leśnych jest bardzo trudne z powodu wielkości ich genomów, specyfiki rozwojowej, jak również braku standaryzowanych metod i gotowych procedur, rutynowo stosowanych w badaniach genetycznych gatunków zielnych (Neale et al. 2013). Lepsze zrozumienie wielu procesów życiowych drzew staje się możliwe dzięki narzędziom genetyki funkcjonalnej i porównawczej. W roślinach drzewiastych scharakteryzowano zmiany proteomiczne we wczesnym procesie aklimatyzacji w liściach *Populus* sp. (Renaut et al. 2004) i korze *Prunus persica* (L.)

Batsch (Renaut et al. 2008), osiągając podobne wyniki do gatunków roślin zielnych. Wprowadzenie nowoczesnych technologii w naukach takich jak proteomika i metabolomika, wspartych wynikami wieloletnich prac nad zmianami fizjologicznymi, biochemicznymi i genetycznymi podczas aklimatyzacji i spoczynku, pozwoliło na zidentyfikowanie wielu głównych podmiotów molekularnych. Zrozumienie funkcjonowania mechanizmów genetycznych regulujących reakcje organizmów drzewiastych na niskie temperatury umożliwi analiza funkcjonalna tych składników *in vitro* i *in vivo*, prowadzona zarówno oddzielnie, jak i łącznie.

W przyszłości jednym z głównych i priorytetowych zadań badawczych w genomice drzew leśnych będzie opracowanie nowych i wysokoprzepustowych technologii fenotypowania (Neale, Kramer 2011), pozwalających wyjaśnić i określić komponenty zmienności fenotypowej. Projekty obecnie zrealizowane i aktualnie realizowane sekwencjonowania genomu w drzewach leśnych są ograniczone do około 40 gatunków, głównie do 4 rodzin spośród 100, tj.: *Pinaceae* (sosny, świerki i jodły), *Salicaceae* (topole i wierzby), *Myrtaceae* (eukaliptus) i *Fagaceae* (dęby, kasztany i buki). Nie są one prowadzone na dużą skalę, tak jak dzieje się to w przypadku genomu człowieka, prostych roślin zielnych, czy owadów (Neale et al. 2013), ale postępy w zakresie wydajności i kosztów sekwencjonowania umożliwiły pierwsze projekty dużych (~ 20 Gbp) genomów wielu gatunków drzew iglastych (Street 2019). Aktualnie najbardziej wszechstronnym źródłem do analiz porównawczo-genomowych u drzew leśnych jest baza danych TreeGenes (Wegrzyn et al. 2008).

W świetle rosnącej presji, jakiej podlegają lasy na całym świecie, zapotrzebowanie na narzędzia dostarczające precyzyjnych informacji genetycznych o drzewach będzie wzrastało, zarówno w obszarze zarządzania lasami, ich ochrony, jak również udoskonalania (Staton et al. 2015). Zasoby genomowe mogą być wykorzystywane jako narzędzia hodowli i ochrony ważnych gatunków drzew, poprzez identyfikację predyspozycji poszczególnych populacji do zmian klimatu i szacowania ich potencjału adaptacyjnego (Segelbacher et al. 2010; Sork et al. 2013). Wyniki uzyskane w badaniach nad reakcją roślin na LT mogą być pomocne w zrozumieniu i przewidywaniu wpływu globalnego ocieplenia na poszczególne gatunki drzew i całe ekosystemy leśne, zwłaszcza w regionach borealnych (Strimbeck et al. 2015). Uważa się bowiem, że globalne ocieplenie ma być największe w zimie i na wyższych szerokościach geograficznych, co będzie miało realny wpływ na fenologię spoczynku i tolerancję LT (Kramer et al. 2000).

Konflikt interesów

Autorki deklaruje brak potencjalnych konfliktów.

Źródło finansowania badań

Badania sfinansowano ze środków własnych.

Literatura

- Benedict C., Skinner J.S., Meng R., Chang Y., Bhalerao R., Huner N.P., Finn C.E., Chen T.H., Hurry V. 2006. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant Cell and Environment* 29: 1259–1272. DOI 10.1111/j.1365-3040.2006.01505.x.
- Cooke J.E., Eriksson M.E., Junttila O. 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell and Environment* 35(10): 1707–28. DOI 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x.
- Du M., Ding G., Cai Q. 2018. The Transcriptomic Responses of *Pinus massoniana* to Drought Stress. *Forests* 9(6): 326. DOI 10.3390/f9060326.
- Floryszczak-Wieczorek J. 2008. Reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe, w: Fizjologia roślin od teorii do nauk stosowanych (red. M. Kozłowska). PWRiL, Poznań, 485–493. ISBN 978-83-09-01023-4.
- Fowler S., Thomashow M.F. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell and Environment* 14: 1675–1690. DOI 10.1105/tpc.003483.
- González-Martínez S., Ersoz E., Brown G., Wheeler N., Neale D. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172(3): 1915–1926. DOI 10.1534/genetics.105.047126.
- Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators *CBF1*, *CBF2*, and *CBF3* have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54: 767–781. DOI 10.1023/B:PLAN.0000040902.06881.d4.
- Graether S.P., Boddington K.F. 2014. Disorder and function: a review of the dehydrin protein Family. *Frontiers in Plant Science* 5(576): 1–12. DOI 10.3389/fpls.2014.00576.
- Harfouche A., Meilan R., Altman A. 2014. Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiology* 34: 1181–1198. DOI 10.1093/treephys/tpu012.
- Holliday J.A., Ralph S.G., White R., Bohlmann J., Aitken S.N. 2008. Global monitoring of autumn gene expression within and among phenotypically divergent populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytologist* 178: 103–122. DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02346.x.
- Hurme P., Sillanpää M.J., Arjas E., Repo T., Savolainen O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156: 1309–1322.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17(3): 287–91. DOI 10.1038/7036.
- Kimieć B., Drynda R., Wołoszyńska M. 2005. Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na temperaturę. *Biotechnologia* 3(70): 184–200.
- Kindgren P., Dubreuil C., Strand Å. 2015. The Recovery of Plastid Function Is Required for Optimal Response to Low Temperatures in Arabidopsis. *PLoS ONE* 10(9): 1–16. DOI 10.1371/journal.pone.0138010.
- Kopcewicz J., Szmidt-Jaworska A., Kannenberg K. 2012. Zarys struktury i fizjologii drzew leśnych. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 441 s. ISBN 978-83-924-4578-4.

- Kramer K., Leinonen I., Loustau D. 2000. The importance of phenology for the evaluation of impact of climate change on growth of boreal, temperate and Mediterranean forests ecosystems: an overview. *International Journal of Biometeorology* 44: 67–75. DOI 10.1007/s004840000066.
- Kurbidaeva A.S., Novokreshchenova M.G. 2011. Genetic Control of Plant Resistance to Cold. *Russian Journal of Genetics* 47(6): 646–661. DOI 10.1134/S1022795411050115.
- Lee Ch., Thomashow M. 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 109(37): 15054–15059. DOI 10.1073/pnas.1211295109.
- Neale D.B., Kremer A. 2011 Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12: 111–122. DOI 10.1038/nrg2931.
- Neale D.B., Langley C.H., Salzberg S.L., Wegrzyn J.L. 2013 Open access to tree genomes: the path to a better forest. *Genome Biology* 14: 120. DOI 10.1186/gb-2013-14-6-120.
- Nose M., Watanabe A. 2014 Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D. Don). *BMC Plant Biology* 14: 308. DOI 10.1186/s12870-014-0308-1.
- Puhakainen T., Li C., Boije-Malm M., Kangasjärvi J., Heino P., Palva E.T. 2004. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology* 136(4): 4299–307. DOI 10.1104/pp.104.047258.
- Rakowski K. 2005. Fizjologiczne i molekularne podstawy reakcji drzew na stresy środowiskowe. Część II. Wpływ fluorowodoru i niskich temperatur. *Leśne Prace Badawcze* 2: 93–105.
- Renaut J., Lutts S., Hoffmann L., Hausman J.F. 2004. Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. *Plant Biology (Stuttgart)* 6(1): 81–90. DOI 10.1055/s-2004-815733.
- Renaut J., Hausman J.F., Bassett C., Artlip T., Cauchie H.M., Witters E., Wisniewski M. 2008. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics and Genomes* 4: 589–600. DOI 10.1007/s11295-008-0134-4.
- Salojärvi J., Smolander O.P., Nieminen K., Rajaraman S., Safronov O., Safdari P., Lamminmäki A., Immanen J., Lan T., Tanskanen J. et al. 2017 Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch. *Nature Genetics* 49(6): 904–912. DOI 10.1038/ng.3862.
- Schrader J., Moyle R., Bhalerao R., Hertzberg M., Lundeberg J., Nilsson P., Bhalerao R.P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *Plant Journal* 40(2): 173–87. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02199.x.
- Segelbacher G., Cushman S.A., Epperson B.K., Fortin M.-J., Franco O., Hardy O.J. et al. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation Genetics* 11: 375–385. DOI 10.1007/s10592-009-0044-5.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Caminci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. 2002 Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31: 279–292. DOI 10.1046/j.1365-313x.2002.01359.x.
- Sork V.L., Aitken S.N., Dyer R.J., Eckert A.J., Legendre P., Neale D.B. 2013. Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. *Tree Genetics and Genomes* 9: 901–911. DOI 10.1007/s11295-013-0596-x.
- Staton M., Best T., Khodwekar S., Owusu S., Xu T., Xu Y., Jennings T., Cronn R., Arumuganathan A.K., Coggeshall M., Gailing O., Liang H., Romero-Severson J., Schlarbaum S., Carlson J.E. 2015. Preliminary Genomic Characterization of Ten Hardwood Tree Species from Multiplexed Low Coverage Whole Genome Sequencing. *PLoS ONE* 10(12): e0145031. DOI 10.1371/journal.pone.0145031.
- Street N. 2019. Chapter One - Genomics of forest trees. *Advances in Botanical Research* 89: 1–37. DOI 10.1016/bs.abr.2018.11.001.
- Strimbeck G.R., Schaberg P.G., Fossdal C.G., Schröder W.P., Kjellsen T.D. 2014. Extreme low temperature tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–15. DOI 10.3389/fpls.2015.00884.
- Thomashow M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571–599. DOI 10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
- Tuteja N. 2009 Chapter 7 – Cold, Salinity, and Drought Stress, in: Hirt H. (ed.) *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*. KGaA, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. P., 137–159. ISBN 978-3-527-32290-9.
- Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. 2009. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidates to genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics and Genomes* 5: 117–132. DOI 10.1007/s11295-008-0188-3.
- Wachowiak W., Wójkiewicz B., Cavers S., Lewandowski A. 2014 High genetic similarity between Polish and North European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations at nuclear gene loci. *Tree Genetics and Genomes* 10(4): 1015–1025. DOI 10.1007/s11295-014-0739-8.
- Wegrzyn J.L., Lee J.M., Tarse B.R., Neale D.B. 2008. TreeGenes: A forest tree genome database. *International Journal of Plant Genomics* 2008: 412875. DOI 10.1155/2008/412875.
- Welling A., Palva E.T. 2006 Molecular control of cold acclimation in trees *Physiologia Plantarum* 127: 167–181. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00672.x.
- Wilczynski S., Durló G., Feliksik E. 2005. Przymrozki wczesne i późne na Kopciowej [Beskid Sadecki]. *Acta Agraria et Silvicultura. Series Silvestris* 43: 65–76.
- Wisniewski M., Bassett C., Gusta L.V. 2003. An overview of cold hardiness in woody plants: seeing the forest through the trees. *Horticultural Science* 38: 952–959. DOI 10.21273/HORTSCI.38.5.952.
- Yang S.H., Loopstra C.A. 2005. Seasonal variation in gene expression for loblolly pines (*Pinus taeda*) from different geographical regions. *Tree Physiology* 25: 1063–1073. DOI 10.1093/treephys/25.8.1063.

Wkład autorów

M.N. – koncepcja, przegląd literatury, napisanie pracy;
K.S. – przegląd literatury, napisanie pracy; M.K. – przegląd literatury, napisanie pracy, redakcja.

Progress in physiological and genetic research concerning forest tree response to low temperature

Maria Novokreshchenova*, Katarzyna Skowrya, Marta Kempf 

University of Agriculture in Krakow, Faculty of Forestry, Institute of Forest Ecology and Silviculture, Department of Genetics and Forest Tree Breeding, al. 29 Listopada 46, 31–425 Kraków, Poland

*Tel. +48 12 6625124, e-mail: maria.novokreshchenova@urk.edu.pl

Abstract. Forest trees are a great model for physiological and genetic studies of plant resistance to unfavourable environmental conditions, since the same species can successfully acclimate at different latitudes. Modern biology, such as genomics, transcriptomics, proteomics, etc., significantly facilitates these studies and accelerates the acquisition of new knowledge. This allows for a more effective implementation of conservation measures and the renewal of forest ecosystems.

This review contains information on the latest scientific achievements in the field of acclimatization and tolerance to abiotic stresses, such as cold and frost, of forest trees. There is no doubt that in the course of evolution forest trees developed a complex and dynamic mechanism for controlling the entry into the winter dormancy stage, which allows woody plants to successfully survive in cold and freezing conditions and is initiated long before the beginning of winter. Studying the function of individual genes in forest tree species, however, remains an incredibly difficult task due to large genomes, specific development as well as the lack of standard techniques and routine procedures. In recent years, similarities between the well-studied genetic response to low temperatures of the model plant *Arabidopsis thaliana* and forest trees have been identified, which produced meaningful analogies and allows for issues of functional genetics to be addressed more effectively.

The main goal of this work was to show that findings from forest tree genomics can be effectively used as a tool for the reproduction and protection of important tree species through the identification of the predisposition of specific populations to climate change and their adaptive capacity.

Keywords: adaptation, tolerance, molecular response to stress, woody plants

1. Introduction

Forest ecosystems, including trees, herbs, microorganisms, animals and so on, perform many important productive, protective, social or recreational functions, while at the same time, by creating specific phytoclimatic conditions, these play a major role in climate change mitigation (Neale, Kremer 2011). Both current and predicted natural phenomena, such as prolonged droughts or frosts, excessive salinity or floods, have a negative impact on the growth and vitality of trees, posing a serious threat to the productivity and sustainability of forests worldwide (Salojärvia et al. 2017). The dying out of trees as a result of abiotic stress, including the impact of low temperatures, is predicted to accelerate in the next few decades (Harfouche et al. 2014).

In forest management, one of the most important meteorological phenomena that should be taken into account in breeding practice is the occurrence of frost. Due to its significant negative economic impact, research work relating to the resistance of forest trees to low temperatures (LT) is developing dynamically (Hurme et al. 2000; Gonzalez-Martinez et al. 2006; Salojärvia et al. 2017).

In characterizing frost, not only should the dates of its occurrence or termination be taken into account, but also its duration and the actual number of days with frost. Frost occurs when the average daily temperature is higher than zero and the minimum temperature falls below this value or when the maximum temperature is higher than zero and the minimum temperature has a negative value. Frost that occurs near the ground is referred to as ground frost, while that

Received: 4.09.2018 r., accepted after revision: 10.12.2019 r.

recorded in a meteorological instrument shelter is referred to as hard frost. For plants, late frosts occurring in spring are particularly dangerous because the leaf buds and shoots developing at that time are more sensitive to low temperatures. Forest crops, saplings and nurseries located in an open area, unprotected from ground-level heat radiation losses, are especially threatened by frosts (Wilczyński et al. 2005).

Traditional breeding techniques can effectively improve both quantitative and qualitative characteristics of trees, such as tree height, crown structure or also partial resistance to biotic and abiotic stress. Unfortunately, due to the long life span of trees, slow ontogenetic changes, long maturity, large genome sizes and the lack of well-characterized mutations, using selection methods to improve forest trees is an arduous and slow process (Harfouche et al. 2014).

Trees, despite a number of limitations in the dynamic development of studies on their tolerance to low temperatures, are an interesting research subject. Woody plants in the boreal zone to the Arctic and high mountains can survive long-term exposure to temperatures below 40°C or even -60°C, and laboratory tests have shown that many of these species can survive immersion in liquid nitrogen at -196°C (Strimbeck et al. 2014). In the taiga forest regions of Siberia and Canada, temperatures range from a record low of -64°C to a record high of +36°C, with a total amplitude of 100°C. In these regions, the evergreen *Pinus* pines, *Picea* spruces, *Abies* firs, together with *Larix* larch and several species of angiosperms are exposed to extreme cold, varying light conditions, as well as strong and dry winds in winter (Strimbeck et al. 2014). Plants from boreal and temperate areas are more able to cope with low and freezing temperatures. In recent years, the breeding capacity of some forest tree species has been developed as a result of advances in genetics and plant genomics. Studies of Siberian and Canadian species with full tolerance to extreme temperatures found that tolerance to low temperatures varies depending on the climate of the place of origin of these species, indicating that this is the result of genetically fixed adaptation and is subject to strong genetic control (Strimbeck et al. 2014).

The aim of this paper is to review the literature on the functional genetics of the phenomenon of the resistance of forest trees to low temperatures.

2. The physiological response of woody plants to low temperatures (LT)

The tolerance of trees to freezing is closely connected to the phases of the vegetation cycle, and thus, their physiological activity. The meristematic activity of top buds stops in response to shortening day lengths, ending with the cessation of growth and initiation of absolute rest. A distinction is made with relative rest, which results from negative external factors such as low

temperature or oxygen deficiency, and disappears when conditions improve. There is also the phenomenon of deep plant dormancy, caused by changes in the internal plant mechanisms relating to hormonal management or genetic predisposition (Kopcewicz et al. 2012). A few weeks after the cessation of bud growth, the buds enter a state of deep dormancy. Parallel to growth cessation, the tolerance of trees to freezing starts increasing in response to the short day's photoperiod. Prolonged exposure to a short day can lead to a significant increase in tolerance to freezing (Fig. 1) (Welling, Palva 2006).

Most of the life support processes in plants are temperature-dependent. This is associated with the thermal adaptation of enzymatic proteins, the development stage of the plant and its growth conditions (Floryszczak-Wieczorek 2008). Thermal stress occurs when the plant is exposed to the effects of sub-optimal temperatures. The following plants are distinguished on the basis of their ability to adapt to temperature:

- plants that are sensitive to cold and have a tolerance range of +10°C to 0°C; these are generally plants growing in tropical and subtropical climates,
- plants that are sensitive to frost, tolerate temperatures of up to 0°C; these are plants that grow in the temperate zone, but are damaged when the temperature is low enough to cause water to crystallize in the plant cells; such plants include the 'drosophila' of plant genetics – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh,
- plants that tolerate freezing with a temperature range of -1°C to -70°C; these are usually trees – perennial terrestrial plants, mosses and algae.

Plants that tolerate freezing, especially trees, are able to withstand the crystallization of water outside the cell and the loss of water by cells during freezing after the autumn acclimatization period. The freezing temperature in the cells is reduced by increased cytoplasm density and partial water loss. The formation of ice crystals in the apoplast is not yet a critical and irreversible situation for the cell. Irreversible damage can be observed when the ice crystals form in the symplast. Therefore, resistance to freezing is mainly based on the formation of ice inside the cell. One of the most important defensive mechanisms is the so-called 'frost plasmolysis', which consists of water penetrating into the apoplast and prevents the 'cooling of the liquid' (Kopcewicz et al. 2012). Reactions caused by frost largely resemble conditions corresponding to a water deficit. This results in a conformational change of proteins and abnormal reactions between the cell wall and its membrane. All these processes lead to the cessation of photosynthesis in the plant (Floryszczak-Wieczorek 2008).

Frost mainly damages the cell membrane through ice crystals, leading to an excessive leakage of electrolytes from the tissues (Tuteja 2009). Another reaction to the cold is the phenomenon of membrane depolarization. Calcium channels open up, which in turn increases the concentration of

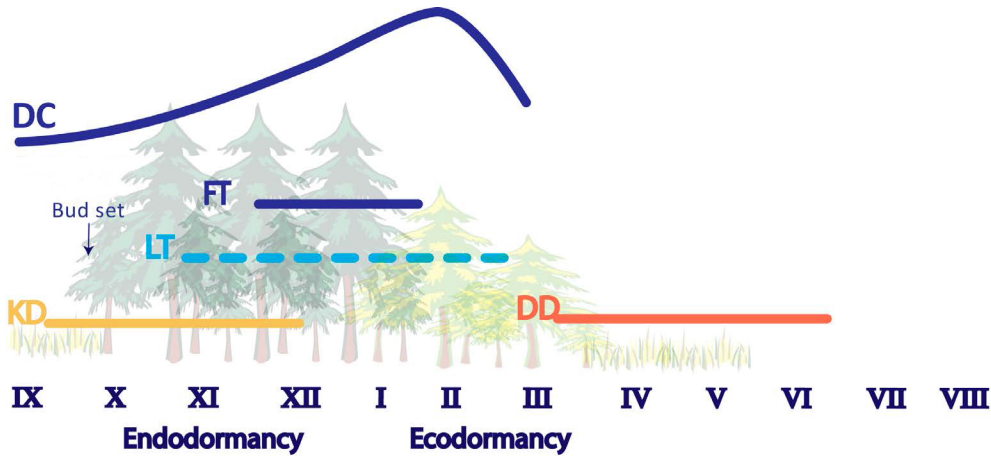


Figure 1. Annual dormancy and freezing tolerance in an adult birch individual during wintering in Poland. DD – long day, KD – short day, LT – low temperature, FT – freezing point temperature. Roman numerals indicate months, DC – dynamics of freezing tolerance, green background color of plants – endodormancy (absolute rest), yellow background color of plants – ecodormancy (relative rest) (Welleng, Palva 2006, adaptation for Poland using <https://www.gismeteo.pl/> and yandex.ru).

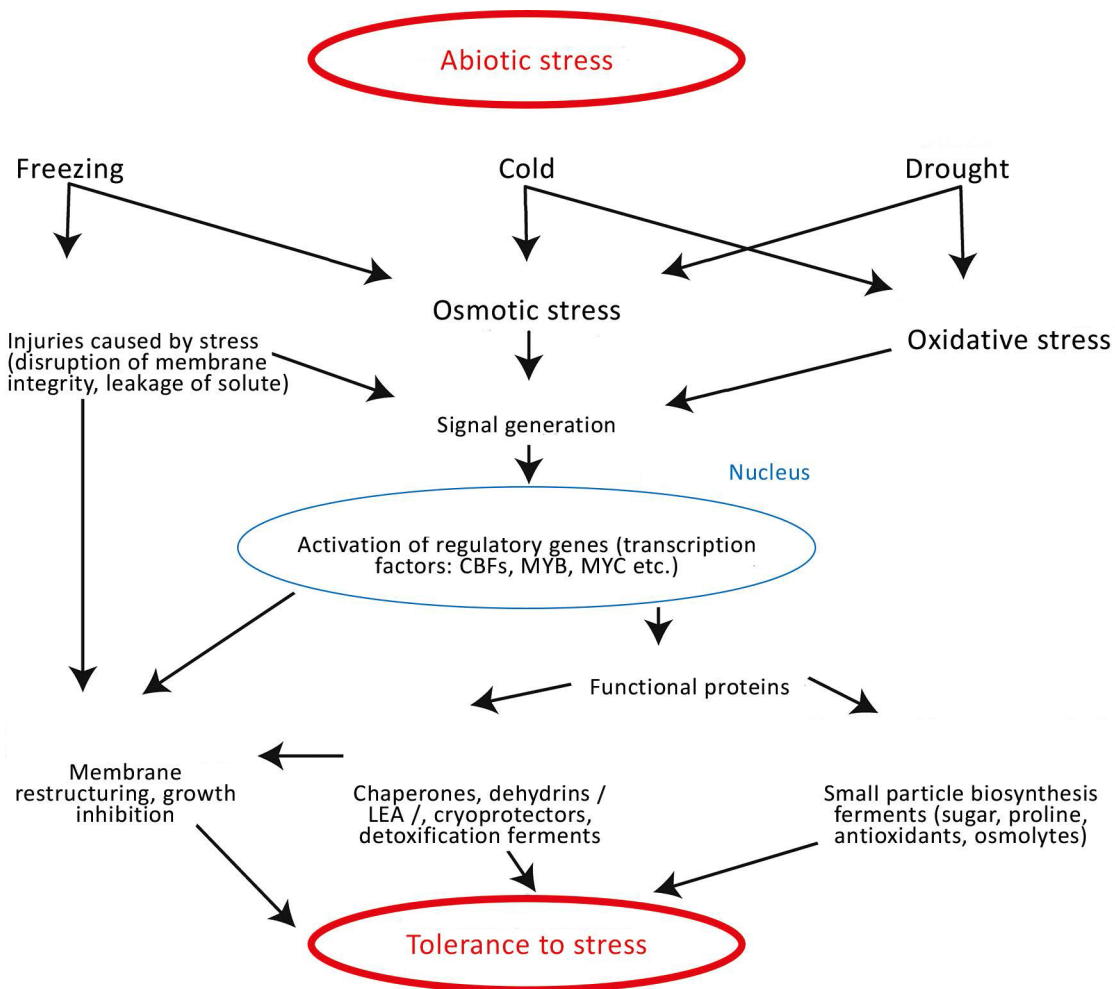


Figure 2. Processes occurring in a plant cell during the abiotic stress response

calcium ions in the cytoplasm. This also applies to the stomata cells, which cause the plant to rapidly wither when opened (Floraszczak-Wieczorek 2008). In general, plants growing in the temperate zone are resistant to cold, but they are threatened by the actions of frost in winter and are therefore forced to develop appropriate defense strategies (Fig. 2).

The cell membrane plays the most important role in low temperature tolerance. Due to its location around the periphery of the cell, it forms the boundary between the external environment and the cytoplasm, participates in ion management and is responsible for water balance. The strength of tolerance largely depends on the stability of the cell membrane, as well as on the ability to adapt, which is influenced by such processes as: changes in membrane properties, hormone levels, sugar content and gene expression. For example, an increase in the content of abscisic acid (ABA) in cells is associated with the resistance of woody plants to cold and frost (Rakowski 2005).

3. The molecular and genetic response of forest trees to LT

The acclimatization of plants to low temperatures is a result of changes in gene transcription (Kimieć et al. 2005). The stress associated with low temperature causes changes in cell metabolism by accelerating the degradation of proteins and slowing down their synthesis. At the same time, new proteins are formed, called stress proteins (Kopcewicz et al. 2012). Classical genetic research has shown that the ability of plants to acclimatize is a quantitative feature, and includes the action of many genes (Tomashow 1999). As already mentioned, one of the main stress factors in cells, resulting from the change of the

water potential in a cell, is dehydration caused by freezing (Wisniewski et al. 2003). Moreover, a cold induced production of a reactive form of oxygen, especially when combined with high light intensity, contributes to even greater membrane damage (Welling, Palva 2006). Therefore, when plant cells acclimatize to the conditions of abiotic stress caused by low temperature, the induction of genes are involved that control membrane stability, biosynthesis of chaperones, strengthening of antioxidant mechanisms and accumulation of sugars and compatible dissolved substances (Tuteja 2009). Numerous changes in the expression of genes during acclimatization to cold conditions (Table 1) have been demonstrated by microarray technology (Fowler, Tomashow 2002; Seki et al. 2002).

Generally, stress-response genes can be divided into two groups: genes that directly participate in protecting cells under stress conditions, and genes that encode components of the signal pathway that regulates gene expressions in response to stress (Tomashow 1999). New tools of functional genomics, widely used in studies on the acclimatization of herbaceous plants to low temperatures, have also been applied in studies on trees entering dormancy and their development of frost tolerance. They include the analysis of the transcriptome and proteome of acclimatizing woody species based on a sequence analysis using the expressed sequence tag (EST) method. This method was used to find several hundred unique transcripts for cold acclimatizing species, that is, blueberries, birch *Betula* spp. and poplar *Populus* spp. It is particularly useful for species whose genome is not yet known, while revealing new genes that may be associated with cold acclimatization and providing an approximate picture of gene expression (Welling, Palva 2006).

Table 1. The study of functional genomics in woody plants regarding wintering (Welling, Palva 2006 with modifications)

| Method | Number of ESTs/genes/and part of the plant | Treatment(s) if specified | Species | Reference |
|----------------|---|--|---|------------------------------------|
| EST sequencing | 4406 and 3649 EST sequences from active and dormant cambium, respectively | summer/autumn (active growth/ dormancy) | poplar <i>Populus tremula</i> L. | Schrader et al. (2004) |
| EST sequencing | 17,500 unigenes | 12 different libraries | birch <i>Betula pendula</i> Roth. | K. Ojala et al. (unpublished data) |
| Microarray | 2171 ESTs from xylem and shoot tip library | seasonal changes in earlywood–latewood | loblolly pine <i>Pinus taeda</i> L. | Yang, Loopstra (2005) |
| Microarray | 21,840 unigenes from needles from the upper lateral lobes this year | summer/autumn (early winter) | sitka spruce <i>Picea sitchensis</i> (Bong.) Carrière | Holliday et al. (2007) |
| Microarray | 7254 unigenes | shoots were collected every four hours for two days in winter and summer | cryptomeria japonica <i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D.Don | Nose, Watanabe (2014) |

The development of research on the functional genetics of forest trees is a response to the continuous need to develop new and improve existing tools for the protection and management of forest populations. One of the main objectives is to develop mechanisms supporting sustainable forest management. On one hand, these activities are based on promoting and enriching existing genetic diversity in forests. This goal will be achieved by understanding evolution and the development of adaptation possibilities in an evolutionary and ecological context (Neale, Kremer 2011). On the other hand, they also support the selective breeding of forest trees and the pursuit of qualitatively and quantitatively appropriate basic material for forests. The selective and genetic improvement of species, especially those with a short production cycle, is intended to ensure a sustainable supply of wood raw material for the wood processing sector.

Unlike herbaceous plants, trees have no single universal model species and there is no species that dominates economically over other species in the world. This situation certainly hinders progress, but with the development of next generation sequencing (NGS) technology, a large number of target species, often with high genetic diversity, will provide the impetus for structural and functional genomics. Sequencing the genomes of the main species will allow reference samples to be established for thousands of sequences of species of lesser economic importance: cultivated and bio-coenotic (Neale, Kremer 2011). In the studies of frost resistance of forest trees, a promising subject that can serve as a model tree is the silver birch *Betula pendula* Roth. It has a northern range, a short life cycle (initiation of flowering within 1 year), and most importantly, it has a short, sequenced genome (440-Mb) (Salojärvia et al. 2017).

In order to effectively use the results of molecular and genetic analyses to improve the resistance of trees to stress caused by abiotic factors, the signal pathways of plants must be understood in detail, and the genes encoding and regulating the synthesis of key proteins need to be identified. Understanding the molecular and genetic basis of the expression of polygenic traits is an important issue in improving the quality of trees, and is also connected to many other areas. Newer technologies, such as genomic selection (GS) and EcoTILLING now provide new ways to improve knowledge about the various processes occurring in forest trees and the role played by key genes (Harfouche et al. 2014). Knowing and deciphering how forest trees adapt to harsh environmental conditions, especially in the face of predicted climate change, will be a great help in the future to meet the demands of the multifunctional model of sustainable forest management that assumes the coexistence of production functions, while ensuring the continuity and sustainability of forests for future generations.

3.1. CBF (C-repeat Binding Factors) transcription factors

One of the most important regulatory paths of the acclimatization process to cold conditions is the CBF/DREB1 response pathway, which has been widely characterized for *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* genome codes a small group of transcription factors known as CBF1-3 or DREB1 A-C respectively (Kurbidaewa, Novokreshchenova 2011). These proteins have a DNA binding domain, very similar to amino acid sequences and are encoded by genes located on 4 chromosomes (successively: AT4G25490, AT4G25470, AT4G25480) (Kmieć et al. 2005). The induction of CBF1-3 genes occurs within 10–15 minutes after exposure of the plant to low temperatures. Maximum expression is achieved within 2–3 hours and ceases after 24 hours (Gilmour et al. 2004). During the accumulation of DREB1 transcripts, the promoters accumulate the mRNA of the relevant genes with a CRT/DRE (C-repeat/dehydration response element) motif, which is a regulatory DNA sequence of genes encoding protective proteins against stress. The genes are induced by a factor called ‘CBF regulon’. It has been proven to contain 109 genes belonging to several groups (Fowler, Thomashow 2002). The contribution of the ‘CBF regulon’ factor to low temperature acclimatization has been demonstrated in studies where the overexpression of CBFs leads to the constitutive expression of target CBF genes, resulting not only in an increased tolerance of plants to freezing, but also an increased resistance to drought and salt (Kasuga et al. 1999; Gilmour et al. 2004). The CBF protein family, conservative among herbaceous plant species, has been found even in plants unable to acclimatize, such as tomatoes and rice (Thomashow 1999).

However, recent molecular and genetic studies clearly show that lowering the temperature leads to the activation of a similar process of signal transmission and expression of orthologous genes both in herbaceous and woody plants. Benedict et al. (2006) cloned the orthology of genes of the CBF family *Arabidopsis thaliana* (AtCBFs) from *Populus balsamifera* L. Studies on the expression of the AtCBFs genes of the poplar have shown their ability to transmit increased tolerance to low temperatures and other abiotic stresses. Experiments with cDNA microarrays allowed genes to be identified that increase their expression by the overexpression of AtCBF1 in this species. A strong similarity of the CBF regulon was found between the poplar and radish and differences between leaf and shoot regulons were identified. Thus, Benedict et al. (2006) were able to demonstrate that the regulation of genes affected by the freezing of wild poplar leaves was similar to the poplar with the transgenic AtCBF gene. However, the varying expression of PtCBF paralogues and different gene groups responding to CBFs in temporal (leaf) and solid (stem) tissues suggests that as a result of the evolution of winter dormancy in perennial plants, the role of these genes in different tissues of woody species may vary.

3.2. Dehydrins

In research on the acclimatization to cold conditions, the most widely analysed proteins are dehydrins, due to their abundance and expected role in protecting cells from dehydration. Several dehydrin genes in their promoter contain LTRE/DRE/CRT (an element of the reaction to low temperature and drought) (Welling, Pavla 2006), which is recognized by CBF transcription factors. In addition, some dehydrins accumulate in response to ABA, the level of which increases due to osmotic stress, including frost (Kurbidaeva, Novokreshchenova 2011). To date, the orthologous genes of abscisic acid response participants (NCED, PYL, etc.) and the deactivation of reactive oxygen species (GPX, GST and GSR) (Du et al. 2018) have been identified in the *Pinus massoniana* transcriptome. In recent years, the physiological role of adaptation-related dehydrins has been actively studied, and although the exact function of most dehydrins has not yet been explained, it has been found that they have a hydrophilic structure that determines the water binding function in the cell and prevents the formation of ice crystals (Graether, Boddington 2014).

The study showed seasonal variability in the expression of dehydrin genes and protein content in different woody plants. This level is high in winter and low in the period of active growth (Welling, Pavla 2006). To analyse the factors that regulate the appearance of dehydrin during wintering, the gene expressions for different environmental conditions were studied. Most dehydrin in woody plant tissues is induced in response to LT or influenced by the shortening day length and then LT (Cooke et al. 2012). In addition, dehydrin was shown to be induced in dormant tissue in response to approaching the freezing point, but only after the tissue had thawed (Welling, Pavla 2006). In *Betula* spp. birch cells, dehydrins were clearly expressed in autumn in response to the short day, and in the middle of winter in response to low temperatures and frost (Welling, Pavla 2006).

After an active growth period at the beginning of summer, trees start to prepare for winter long before unfavourable conditions appear (Welling, Pavla 2006). Schrader et al. (2004) used the cryosection method to isolate purified cambial meristem cells from the woody plant *Populus tremula* during active growth and dormancy. They demonstrated that genes of the PttCBFs family, as well as those of the PttLEA family (Late Embryogenesis Abundant, dehydrins), are more pronounced in poplar meristems grown in the field in response to the short day that may indirectly affect the expression of frost resistance genes during acclimatization. As Puhakainen et al. suggest (2004), the short day also has a direct effect on genes induced by low temperature. It has been shown that it increases the induction of birch dehydrin genes controlled by CBF (Puhakainen et al. 2004). This issue has been extensively analysed

on the example of the model plant *Arabidopsis thaliana*, for which it has been shown that the expression of the CBF1 gene is dependent on diurnal rhythms (Lee, Thomashow 2012).

An example of the current trends and rapid progress in functional genomics research in forestry is the Scots pine *Pinus sylvestris* L. The species, despite its important ecological and economic role as well as its extensive range in Europe and Asia (Wachowiak et al. 2014), has remained out of the orbit of research possibilities for years due to its huge genome. Recently, thanks to the rapid development of technology, it has been possible to change the nucleotide in the haplotypes in several gene-candidates' response to LT of selected European Scots pine populations exhibiting a disparity in cold tolerance. Significant variation in the allelic frequency structure of haplotypes was detected in seven locations of the dehydrin gene family, including *dhn1* and *dhn3* (Wachowiak et al. 2009), and *abaR* (abscisic acid-responsive protein), which is the orthologue of the *AtGUN5* gene. Its product was identified as a potential component involved in the signal reception between the chloroplast and the cell nucleus during the acclimatization of plants to low temperatures (Wachowiak et al. 2009; Kindgren et al. 2015).

4. Summary

The high intra-population variability of trees provides excellent opportunities to understand the molecular basis of the functioning of plant organisms (Neale et al. 2013), including their response to changes in environmental conditions. It is very difficult to understand the functions of individual genes in forest tree species due to the size of their genomes, developmental specificity, as well as the lack of standardized methods and ready-made procedures routinely used in the genetic research of herbaceous species (Neale et al. 2013). A better understanding of the many life processes of trees is being made possible by the tools of functional and comparative genetics. In woody plants, the proteomic changes in the early acclimatization process of the leaves of *Populus* sp. (Renaut et al. 2004) and the bark of *Prunus persica* (Renaut et al. 2008) has been characterized, achieving similar results to herbaceous plant species. The introduction of modern technologies in such sciences as proteomics and metabolomics, supported by the results of many years of work on the physiological, biochemical and genetic changes occurring during acclimatization and dormancy, allowed many major molecular agents to be identified. Understanding the functioning of genetic mechanisms regulating the reactions of woody organisms to low temperatures will enable a functional analysis of these components to be conducted in vitro and in vivo, both separately and jointly.

In the future, one of the main and priority research tasks in forest tree genomics will be the development of new and high-throughput phenotyping technologies (Neale, Kramer 2011)

to clarify and define the components of phenotypic variability. Current and ongoing projects sequencing the genome of forest trees are limited to about 40 species, mainly to 4 families out of 100, that is: *Pinaceae* (pines, spruces and firs), *Salicaceae* (poplars and willows), *Myrtaceae* (eucalyptus) and *Fagaceae* (oaks, chestnuts and beeches). They are not conducted on a large scale, as is the case with the human genome, simple herbaceous plants or insects (Neale et al. 2013), but advances in sequencing efficiency and cost have enabled the first projects of the large (~ 20 Gbp) genomes of many coniferous tree species (Street 2019). Currently, the TreeGenes database (Wegrzyn et al. 2008) is the most comprehensive source for the comparative genome analyses of forest trees.

In light of the increasing pressure on forests around the world, the need for tools to provide accurate genetic information on trees will increase, both in the areas of forest management, conservation and improvement (Staton et al. 2015). Genomic resources can be used as tools for breeding and preserving important tree species by identifying the predisposition of individual populations to climate change and estimating their adaptation potential (Segelbacher et al. 2010; Sork et al. 2013). The results obtained in the research on the response of plants to LT can help us understand and predict the impact of global warming on individual tree species and entire forest ecosystems, especially in boreal regions (Strimbeck et al. 2015). It is believed that global warming is expected to be greatest in winter and at higher latitudes, which will tangibly impact dormancy phenology and tolerance of LT (Kramer et al. 2000).

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgements and source of funding

The research was financed from own sources.

References

- Benedict C., Skinner J.S., Meng R., Chang Y., Bhalerao, R., Huner N.P., Finn C.E., Chen T.H., Hurry V. 2006. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant Cell and Environment* 29: 1259–1272. DOI 10.1111/j.1365-3040.2006.01505.x.
- Cooke J.E., Eriksson M.E., Junttila O. 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell and Environment* 35(10): 1707–28. DOI 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x.
- Du M., Ding G., Cai Q. 2018. The Transcriptomic Responses of *Pinus massoniana* to Drought Stress. *Forests* 9(6): 326. DOI 10.3390/f9060326.
- Floryszczak-Wieczorek J. 2008. Reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe, w: *Fizjologia roślin od teorii do nauk stosowanych* (red. M. Kozłowska). PWRiL, Poznań, 485–493. ISBN 978-83-09-01023-4.
- Fowler S., Thomashow M.F. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell and Environment* 14: 1675–1690. DOI 10.1105/tpc.003483.
- González-Martínez S., Ersoz E., Brown G., Wheeler N., Neale D. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172(3): 1915–1926. DOI 10.1534/genetics.105.047126.
- Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators *CBF1*, *CBF2*, and *CBF3* have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54: 767–781. DOI 10.1023/B:PLAN.0000040902.06881.d4.
- Graether S.P., Boddington K.F. 2014. Disorder and function: a review of the dehydrin protein Family. *Frontiers in Plant Science* 5(576): 1–12. DOI 10.3389/fpls.2014.00576.
- Harfouche A., Meilan R., Altman A. 2014. Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiology* 34: 1181–1198. DOI 10.1093/treephys/tpu012.
- Holliday J.A., Ralph S.G., White R., Bohlmann J., Aitken S.N. 2008. Global monitoring of autumn gene expression within and among phenotypically divergent populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytologist* 178: 103–122. DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02346.x.
- Hurme P., Sillanpää M.J., Arjas E., Repo T., Savolainen O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156: 1309–1322.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17(3): 287–91. DOI 10.1038/7036.
- Kimieć B., Drynda R., Wołoszyńska M. 2005. Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na temperaturę. *Biotechnologia* 3(70): 184–200.
- Kindgren P., Dubreuil C., Strand Å. 2015. The Recovery of Plastid Function Is Required for Optimal Response to Low Temperatures in Arabidopsis. *PLoS ONE* 10(9): 1–16. DOI 10.1371/journal.pone.0138010.
- Kopcewicz J., Szmidi-Jaworska A., Kannenberg K. 2012. *Zarys struktury i fizjologii drzew leśnych*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 441 s. ISBN 978-83-924-4578-4.
- Kramer K., Leinonen I., Loustau D. 2000. The importance of phenology for the evaluation of impact of climate change on growth of boreal, temperate and Mediterranean forests ecosystems: an overview. *International Journal of Biometeorology* 44: 67–75. DOI 10.1007/s004840000066.
- Kurbidaeva A. S., Novokreshchenova M.G. 2011. Genetic Control of Plant Resistance to Cold. *Russian Journal of Genetics* 47(6): 646–661. DOI 10.1134/S1022795411050115.

- Lee Ch., Thomashow M. 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 109(37): 15054–15059. DOI 10.1073/pnas.1211295109.
- Neale D.B., Kremer A. 2011 Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12: 111–122. DOI 10.1038/nrg2931.
- Neale D.B., Langley C.H., Salzberg S.L., Wegrzyn J.L. 2013 Open access to tree genomes: the path to a better forest. *Genome Biology* 14: 120. DOI 10.1186/gb-2013-14-6-120.
- Nose M., Watanabe A. 2014 Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don). *BMC Plant Biology* 14: 308. DOI 10.1186/s12870-014-0308-1.
- Puhakainen T., Li C., Boije-Malm M., Kangasjärvi J., Heino P., Palva E.T. 2004. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology* 136(4): 4299–307. DOI 10.1104/pp.104.047258.
- Rakowski K. 2005. Fizjologiczne i molekularne podstawy reakcji drzew na stresy środowiskowe. Część II. Wpływ fluorowodoru i niskich temperatur. *Leśne Prace Badawcze* 2: 93–105.
- Renaut J., Lutts S., Hoffmann L., Hausman J.F. 2004. Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. *Plant Biology (Stuttgart)* 6(1): 81–90. DOI 10.1055/s-2004-815733.
- Renaut J., Hausman J.F., Bassett C., Artlip T., Cauchie H.M., Witters E., Wisniewski M. 2008. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics Genomes* 4: 589–600. DOI 10.1007/s11295-008-0134-4.
- Salojärvi J., Smolander O.P., Nieminen K., Rajaraman S., Safronov O., Safdari P., Lamminmäki A., Immanen J., Lan T., Tanskanen J. et al. 2017 Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch. *Nature Genetics* 49(6): 904–912. DOI 10.1038/ng.3862.
- Schrader J., Moyle R., Bhalerao R., Hertzberg M., Lundeberg J., Nilsson P., Bhalerao R.P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *Plant Journal* 40(2): 173–87. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2004.02199.x.
- Segelbacher G., Cushman S.A., Epperson B.K., Fortin M.-J., Francis O., Hardy O.J. et al. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation Genetics* 11: 375–385. DOI 10.1007/s10592-009-0044-5.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. 2002 Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31: 279–292. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2002.01359.x.
- Sork V.L., Aitken S.N., Dyer R.J., Eckert A.J., Legendre P., Neale D.B. 2013. Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. *Tree Genetics and Genomes* 9: 901–911. DOI 10.1007/s11295-013-0596-x.
- Staton M., Best T., Khodwekar S., Owusu S., Xu T., Xu Y., Jennings T., Cronn R., Arumuganathan A.K., Coggeshall M., Gailing O., Liang H., Romero-Severson J., Schlarbaum S., Carlson J.E. 2015. Preliminary Genomic Characterization of Ten Hardwood Tree Species from Multiplexed Low Coverage Whole Genome Sequencing. *PLoS ONE* 10(12): e0145031. DOI 10.1371/journal.pone.0145031.
- Street N. 2019. Chapter One - Genomics of forest trees. *Advances in Botanical Research* 89: 1–37. DOI 10.1016/bs.abr.2018.11.001.
- Strimbeck G.R., Schaberg P.G., Fossdal C.G., Schröder W.P., Kjellsen T.D. 2014. Extreme low temperature tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–15. DOI 10.3389/fpls.2015.00884.
- Thomashow M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571–599. DOI 10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
- Tuteja N. 2009 Chapter 7 – Cold, Salinity, and Drought Stress, in: Hirt H. (ed.) *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*. KGaA, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. P., 137–159. ISBN 978-3-527-32290-9.
- Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. 2009. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics and Genomes* 5: 117–132. DOI 10.1007/s11295-008-0188-3.
- Wachowiak W., Wójkiewicz B., Cavers S., Lewandowski A. 2014 High genetic similarity between Polish and North European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations at nuclear gene loci. *Tree Genetics and Genomes* 10(4): 1015–1025. DOI 10.1007/s11295-014-0739-8.
- Wegrzyn J.L., Lee J.M., Tarse B.R., Neale D.B. 2008. TreeGenes: A forest tree genome database. *International Journal of Plant Genomics* 2008: 412875. DOI 10.1155/2008/412875.
- Welling A., Palva E.T. 2006 Molecular control of cold acclimation in trees *Physiologia Plantarum* 127: 167–181. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00672.x.
- Wilczynski S., Durlo G., Feliksik E. 2005. Przymrozki wczesne i późne na Kopciowej [Beskid Sadecki]. *Acta Agraria et Silvicultura. Series Silvestris* 43: 65–76.
- Wisniewski M., Bassett C., Gusta L.V. 2003. An overview of cold hardiness in woody plants: seeing the forest through the trees. *Horticultural Science* 38: 952–959. DOI 10.21273/HORTSCI.38.5.952.
- Yang S.H., Loopstra C.A. 2005. Seasonal variation in gene expression for loblolly pines (*Pinus taeda*) from different geographical regions. *Tree Physiology* 25: 1063–1073. DOI 10.1093/treephys/25.8.1063.

Contribution of the authors

M.N. – concept, literature review, manuscript writing; K.S. – literature review, manuscript writing; M.K. – literature review, manuscript writing, editing.