



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH I WETERYNARYJNYCH

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Academia Scientiarum Thoruniensis

mgr Sebastian Burchardt

**Ocena przydatności kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) w łagodzeniu skutków suszy
glebowej w korzeniach łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Promotor: dr hab. Emilia Wilmowicz, prof. UMK
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor pomocniczy: dr Agata Kućko
Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

TORUŃ, 2026

„Bo to jest tak, że ja muszę rozumieć świat”

~Richard P. Feynman

Paniom dr hab. Emilii Wilmowicz, prof. UMK i dr Agacie Kućko

Za poświęcony czas, nadzór merytoryczny, cenne uwagi, wsparcie i zaangażowanie na każdym etapie studiów i podczas przygotowywania pracy doktorskiej oraz wiarę we mnie.

Mojej najdroższej żonie, Natalii

Za wsparcie, wyrozumiałość, troskę oraz obecność w każdej dobrej i trudnej chwili.

Aleksandrze Florkiewicz, Tomaszowi Przywieczerskiemu i pozostałym przyjaciołom

Za to, że byliście ze mną, gotowi do wysłuchania i wsparcia.

Moim Rodzicom i Bratu

To dzięki Wam obrałem ten kierunek w życiu i jestem z niego dumny.

Dziękuję.

FINANSOWANIE BADAŃ

Część prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej wyników jest rezultatem badań finansowanych ze środków pozyskanych w ramach programów i konkursów wyszczególnionych poniżej:

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie Ministerstwo Edukacji i Nauki):

- Program „Diamantowy Grant IX” przyznany na mocy umowy zawartej na podstawie decyzji Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 0180/DIA/2020/49 z dnia 11.09.2020 r. Projekt pn. „Wpływ stresu suszy glebowej na zmiany metabolizmu i szlaku transdukcji sygnału jasmonianów zachodzące w korzeniu łubinu żółtego oraz na modyfikacje składu mikrobiomu korzeniowego”. Numer rejestracyjny: DI2019/0180/49.
- Program „Inicjatywa doskonałości - uczelnia badawcza” (IDUB), wprowadzony na mocy ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.:
 - Konkurs Grants 4NCU Students edycja I - wniosek indywidualny o finansowanie badań, projekt pn. „Do changes in lipid content in yellow lupine root nodules increase its resistance to drought stress?”;
 - Konkurs Grants 4NCU Students edycja VII - wniosek indywidualny o finansowanie badań, projekt pn. „Plant hormone imaging in the determine the effect of γ -PGA on root nodules of yellow lupin subjected to soil drought stress?”;
 - Konkurs na wybór zespołów badawczych reprezentujących wyłaniające się pola badawcze Cells as EXperimental platforms and bioFACTories (CExFact) - członek zespołu, lider - dr hab. Krzysztof Zienkiewicz, prof. UMK.

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych „Academia Scientiarum Thoruniensis”:

- Program Minigranty AST – wnioski o dofinansowanie kosztów udziału w konferencjach i warsztatach:
 - Wniosek o przyznanie środków na udział w szkoleniu pn. „Analiza danych proteomicznych - chromatografia - spektrometria masowa”, organizowanym przez firmę Xenstats sp. z o.o. Minigranty edycja III/2023;
 - Wniosek o przyznanie środków na udział w szkoleniu pn. „Chromatografia Gazowa ze Spektrometrią Mas”, organizowanym przez firmę Ekotechlab – Laboratorium chemiczne. Minigranty edycja I/2025.

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu, Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii:

- Środki przyznane w ramach prowadzenia podstawowej działalności badawczej (PDB) Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii, numer projektu: 4001.00000011; numery budżetów:
 - rok 2022 – 03.06.00000272;
 - rok 2023 – 03.06.00000436;
 - rok 2024 – 03.06.00000635;
 - rok 2025 – 03.06.00000889.

SPIS TREŚCI

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
WYKAZ ŁACIŃSKICH I POLSKICH NAZW GATUNKOWYCH STOSOWANYCH W PRACY	10
STRESZCZENIE	12
ABSTRACT	14
1. WSTĘP.....	16
1.1. Susza w warunkach zmian klimatycznych	16
1.1.1. Typy, przyczyny oraz trendy występowania suszy w ujęciu globalnym i w Polsce.....	16
1.2. Mechanizmy adaptacyjne roślin do stresu suszy	18
1.2.1. Odpowiedzi fizjologiczne i biochemiczne	18
1.2.2. Rola mikroorganizmów ryzosferowych promujących wzrost roślin.....	25
1.3. Rośliny strączkowe.....	26
1.3.1. Znaczenie gospodarcze i środowiskowe	26
1.3.2. Symbioza z bakteriami brodawkowymi.....	27
1.3.3. Łubin żółty (<i>Lupinus luteus</i> L.) jako obiekt badań	31
1.4. Biologiczne metody łagodzenia stresu	34
1.4.1. Biopolimery	34
1.4.1.1. Kwas poli γ -glutaminowy (γ -PGA).....	35
1.5. Luka badawcza i uzasadnienie podjęcia badań.....	39
2. CEL PRACY	41
3. MATERIAŁY I METODY	43
3.1. Materiały	43
3.1.1. Materiał roślinny, warunki uprawy i warianty badawcze	43
3.1.2. Odczynniki i dostępne komercyjnie gotowe zestawy	46
3.1.3. Roztwory podstawowe oraz bufory	48
3.1.4. Żele do przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego RNA i białek.....	49
3.2. Metody.....	50
3.2.1. Ocena pokroju roślin, pomiar parametrów biometrycznych i fizjologicznych	50
3.2.2. Ocena maksymalnej wydajności fotosystemu II	50
3.2.3. Badanie względnej zawartości wody w korzeniach	51
3.2.4. Oznaczenie poziomu markerów stresu	51
3.2.5. Izolacja i oznaczanie poziomu pektyn	54
3.2.6. Analizy molekularne	54
3.2.6.1. Izolacja całkowitego RNA	54
3.2.6.2. Analiza ilościowa i jakościowa RNA	55
3.2.6.3. Reakcje qRT-PCR.....	55
3.2.6.3.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	55
3.2.6.3.2. Badanie ekspresji genów w czasie rzeczywistym	56
3.2.6.4. Analizy białek.....	58
3.2.6.4.1. Izolacja	58
3.2.6.4.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	58
3.2.6.4.3. Western-blot	59
3.2.6.4.4. Dot blot.....	59
3.2.6.4.5. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym.....	60
3.2.6.4.6. Oznaczenie aktywności katalazy i peroksydazy w żelu	62
3.2.6.4.7. Spektrofotometryczne oznaczenie aktywności peroksydazy gwajakolowej	63
3.2.7. Przygotowanie materiału do analiz mikroskopowych	63
3.2.8. Krojenie materiału na półciénie skrawki i analiza histologiczna	64
3.2.9. Immunofluorescencyjna lokalizacja związków	64
3.2.10. Analiza ultrastruktury	65
4. WYNIKI.....	67
4.1. Optymalizacja dawki oraz czasu aplikacji γ -PGA.....	67
4.2. Wpływ γ -PGA na strukturę brodawek korzeniowych <i>L. luteus</i> uprawianego w warunkach suszy glebowej	72
4.3. Gospodarka redoks w korzeniach <i>L. luteus</i> w warunkach suszy i po zastosowaniu γ -PGA.....	74

4.4.	Wpływ γ -PGA na strukturę ścian komórkowych brodawek korzeniowych <i>L. luteus</i> w warunkach suszy glebowej.....	78
4.5.	Wpływ suszy glebowej i γ -PGA na czynniki molekularne regulujące powstawanie i funkcjonowanie brodawek korzeniowych.....	84
4.6.	Wpływ γ -PGA na przemiany hormonalne zachodzące w brodawkach korzeniowych <i>L. luteus</i> uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie.....	85
4.6.1.	Kwas abscysynowy.....	85
4.6.2.	Etylen.....	87
4.6.3.	Kwas jasmonowy.....	89
4.7.	Wpływ γ -PGA na przemiany lipidowe zachodzące w brodawkach i korzeniach <i>L. luteus</i> uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie	90
4.8.	Susza i γ -PGA modyfikują profil białek w korzeniu <i>L. luteus</i>	93
5.	DYSKUSJA	97
6.	WNIOSKI	124
7.	LITERATURA	125

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót	Rozwinięcie
μm	mikrometr
¹ O ₂	tlen singletowy
2DE	dwukierunkowa elektroforeza
ABA	kwasy abscysynowe
ACC	kwasy 1-aminocyklopropano-1-karboksylowe
APS	nadsiarczany amonu
APX	peroksydaza askorbinianowa
ASC	kwasy askorbinowe
ATP	adenozynotryfosforan
BHT	butylowany hydroksytoluen
BSA	albumina surowicy bydlęcej
CAT	katalaza
cDNA	komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy
cm	centymetr
COI1	CORONATINE INSENSITIVE1
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DEG	geny ulegające różnicowej ekspresji
DHA	kwasy dehydroaskorbinowe
DTT	ditiotreitol
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, inhibitor proteaz
EDAC	chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu
EDTA	dwuwodna sól tetrasodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
ET	etylen
EtOH	alkohol etylowy
FAAH	amidowa hydrolaza kwasów tłuszczowych
Fe ²⁺	kation żelaza (II)
Fe ³⁺	kation żelaza (III)
FFA	wolne kwasy tłuszczowe
Fm	fluorescencja maksymalna
Fv	fluorescencja zmienna
FW	świeża masa
g	gram
g	przyspieszenie ziemskie
GSH	glutathion
GWPX	peroksydaza gwajakolowa
h	godzina
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
ha	hektar
HG	homogalakuronany
HO•	rodnik hydroksylowy
HRP	peroksydaza chrzanowa
JA	kwasy jasmonowe
JAs	jasmoniany

JAZ	białko domeny ZIM1 jasmonianów
kDa	tysiąc Daltonów
KI	jodek potasu
l	litr
LED	dioda elektroluminescencyjna
LOX	lipooksygenaza
M	mol
mA	miliamper
MALDI-TOF	laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą z analizą czasu przelotu
MALDI-TOF/TOF	laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą z analizą czasu przelotu oraz dodatkową analizą fragmentacji
MDA	dialdehyd malonowy
MDHA	kwas monodehydroaskorbinowy
mg	miligram
min	minuta
NBT	błękit nitrotetrazolowy
O ₂ ^{•-}	anionorodnik nadadtlenkowy
PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PLD	fosfolipaza D
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
RG-I	ramnogalakturnony typu I
RG-II	ramnogalakturnony typu II
RNA	kwas rybonukleinowy
rpm	liczba obrotów na minutę
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
RWC	względna zawartość wody
s	sekunda
SDS	sól sodowa siarczanu dodecylu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
SOD	dysmutaza nadadtlenkowa
t	tona
TBE	bufor tris/kwas borowy/EDTA
TCA	kwas trichlorooctowy
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
U	unit
UV	promieniowanie ultrafioletowe
V	Volt
WHC	pełna pojemność wodna
XGA	ksylogalakturnony
XyG	ksyloglukany
ZEP	epoksydaza zeaksantyny
γ-PGA	kwas poli-γ-glutaminowy

**WYKAZ ŁACIŃSKICH I POLSKICH NAZW GATUNKOWYCH
STOSOWANYCH W PRACY**

Nazwa gatunkowa	Polski odpowiednik
<i>Allium cepa</i>	cebula zwyczajna
<i>Anthurium scandens</i>	–
<i>Antirrhinum majus</i>	wyżlin większy
<i>Arabidopsis thaliana</i>	rzodkiewnik pospolity
<i>Arachis hypogaea</i>	orzacha podziemna
<i>Arundo donax</i>	łasecznica trzcinowata
<i>Bacillus</i>	–
<i>Brachypodium distachyon</i>	kłosownica dwukłoskowa
<i>Bradyrhizobium</i>	–
<i>Brassica napus</i>	rzepak
<i>Brassica rapa</i>	kapusta właściwa
<i>Capsicum annuum</i>	papryka roczna
<i>Casuarina cunninghamiana</i>	dąb rzeczny
<i>Cicer arietinum</i>	ciecierzyca pospolita
<i>Citrus</i>	cytrusy
<i>Coronilla</i>	cieciorka
<i>Cosmos sulphureus</i>	kosmos siarkowy
<i>Craterostigma wilmsa</i>	–
<i>Cucumis sativus</i>	ogórek siewny
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	–
<i>Eleocharis dulcis</i>	ponikło słodkie
<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	–
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	–
<i>Fabaceae</i>	bobowate
<i>Festuca rubra</i>	kostrzewa czerwona
<i>Glycine max</i>	soja zwyczajna
<i>Gossypium</i>	bawełna
<i>Gossypium hirsutum</i>	bawełna kosmata
<i>Helianthus annuus</i>	słonecznik zwyczajny
<i>Ipomoea batatas</i>	wilec ziemniaczany, batat
<i>Lactuca sativa</i>	sałata siewna
<i>Lens culinaris</i>	soczewica jadalna
<i>Lolium perenne</i>	życica trwała
<i>Lotus japonicus</i>	lotos japoński
<i>Lupinus albus</i>	łubin biały
<i>Lupinus angustifolius</i>	łubin wąskolistny
<i>Lupinus atlanticus</i>	–
<i>Lupinus luteus</i>	łubin żółty
<i>Medicago</i>	lucerna
<i>Medicago lupulina</i>	lucerna nerkowata
<i>Medicago sativa</i>	lucerna siewna
<i>Morus alba</i>	morwa biała
<i>Myrothamnus flabellifolius</i>	–
<i>Nicotiana glauca</i>	–
<i>Nicotiana glauca</i>	–
<i>Nicotiana tabacum</i>	tytoń szlachetny

<i>Ocimum basilicum</i>	bazylia pospolita
<i>Panicum miliaceum</i>	proso zwyczajne
<i>Pennisetum americanum</i>	rozplenica perłowa
<i>Pennisetum purpureum</i>	rozplenica słoniowa
<i>Petunia hybrida</i>	petunia ogrodowa
<i>Phaseolus vulgaris</i>	fasola zwyczajna
<i>Pinus radiata</i>	sosna kalifornijska
<i>Pisum sativum</i>	groch zwyczajny
<i>Populus</i>	topola
<i>Populus euphratica</i>	topola eufracka
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pałeczka ropy błękitnej
<i>Pseudomonas putida</i>	–
<i>Pseudomonas syringae</i>	–
<i>Raphanus sativus</i>	rzodkiew zwyczajna
<i>Rhizobiaceae</i>	–
<i>Rhizobium</i>	–
<i>Salicornia europaea</i>	soliród zielny
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	szałwia czerwona
<i>Salvia officinalis</i>	szałwia lekarska
<i>Setaria italica</i>	włośnica ber
<i>Solanum lycopersicum</i>	pomidor zwyczajny
<i>Solanum tuberosum</i>	ziemniak
<i>Sorghum</i>	sorgo
<i>Sorghum bicolor</i>	sorgo dwubarwne
<i>Thellungiella halophila</i>	–
<i>Trifolium</i>	koniczyna
<i>Trifolium repens</i>	koniczyna biała
<i>Triticum aestivum</i>	pszenica zwyczajna
<i>Triticum durum</i>	pszenica twarda
<i>Vicia cracca</i>	wyka ptasia
<i>Vicia faba</i>	wyka bób
<i>Vicia lens</i>	soczewica
<i>Vigna unguiculata</i>	wspiega węzowata
<i>Zea mays</i>	kukurydza zwyczajna

STRESZCZENIE

Obniżone plonowanie łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) wynika z jego wysokiej wrażliwości na stres suszy, który zaburza funkcjonowanie systemu korzeniowego i aktywność brodawek, redukując ilość wiązanego azotu atmosferycznego. Jednym z ekologicznych rozwiązań ograniczających negatywne skutki deficytu wody u roślin są biostymulatory. Celem pracy była ocena potencjału jednego z nich, biodegradowalnego polimeru, kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) w łagodzeniu skutków suszy w korzeniach *L. luteus*. Wykazano, że związek ten wywołuje efekty zależne od dawki, terminu aplikacji oraz długości trwania stresu. Rośliny poddane działaniu γ -PGA w początkowej fazie deficytu wody koncentrują zasoby na ochronie metabolizmu podstawowego, odkładając w czasie energochłonną symbiozę. We wczesnym stadium suszy polimer stabilizuje aparat fotosyntetyczny, poprawia turgor tkanek i stymuluje wzrost roślin. Utrzymanie interakcji symbiotycznych wymaga jednak jego aplikacji w późniejszej fazie stresu. Niezależnie od długości ekspozycji roślin na suszę, γ -PGA normalizuje homeostazę osmotyczną, ograniczając konieczność akumulacji proliny. Ponadto selektywnie aktywuje mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, unikając kosztownej i niekontrolowanej indukcji całego systemu. Polimer znosi indukowany przez suszę wzrost aktywności peroksydazy gwajakolowej, a jednocześnie umożliwia detoksykację nadtlenu wodoru głównie przez peroksydazę askorbinianową, wskutek czego łagodzi stres oksydacyjny, redukując peroksydację lipidów. Związek ten indukuje również remodelowanie metabolizmu ściany komórkowej związane z obecnością nisko- i wysokometylowanych pektyn, arabinanów i galaktanów, ksyloglukanów i ksylogalakturnanów, odwracając zmiany wywołane suszą. Minimalizuje to uszkodzenia i umożliwia zachowanie integralności strukturalnej komórek brodawek, szczególnie w strefie wiązania azotu, co sprzyja utrzymaniu symbiozy w warunkach odwodnienia. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w analizach mikroskopowych struktury tkankowej i komórkowej brodawek, w których po aplikacji γ -PGA nie stwierdzono degradacyjnych zmian indukowanych suszą. Polimer podtrzymuje fizjologiczną funkcjonalność tych struktur, co przejawia się odwróceniem negatywnego wpływu stresu na ekspresję genów istotnych dla funkcjonowania brodawek (*LIBOP* i *LILbL*). Aplikacja γ -PGA w warunkach suszy hamuje nadmierną aktywację szlaków biosyntezy fitohormonów stresowych poprzez modulowanie ekspresji genów ich biosyntezy: *LIACS*, *LIACO*, *LIZEP*, *LILOX*, czego konsekwencją jest zmiana tkankowej dystrybucji prekursora etylenu, kwasu abscysynowego i kwasu jasmonowego.

Modyfikacja rozmieszczenia amidowej hydrolazy kwasów tłuszczowych, związanej z katabolizmem lipidowych mediatorów sygnałowych, w odpowiedzi na γ -PGA wskazuje na aktywację adaptacyjnych mechanizmów homeostazy lipidowej. Na poziomie proteomicznym γ -PGA wzmacnia systemy antyoksydacyjne, modyfikuje gospodarkę aminokwasową oraz zwiększa syntezę związków ochronnych, przy jednoczesnym zachowaniu symbiozy i podstawowych procesów metabolicznych.

Reasumując, γ -PGA, działając wielopoziomowo poprzez regulację homeostazy redoks, fitohormonalnej oraz lipidowej, a także przebudowę ściany komórkowej, stabilizuje metabolizm komórek korzeni i podnosi odporność *L. luteus* na deficyt wody.

ABSTRACT

The reduced yield of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) results from its high sensitivity to drought stress, which disrupts root system functioning and nodule activity, thereby decreasing atmospheric nitrogen fixation. One environmentally friendly approach to limiting the negative effects of water deficit in plants is the use of biostimulants. This study aimed to evaluate the potential of one such stimulant, the biodegradable polymer poly- γ -glutamic acid (γ -PGA), to alleviate drought effects in the roots of *L. luteus*. It was demonstrated that this compound exerts effects that depend on dose, time of application, and stress duration. Plants treated with γ -PGA at the onset of water deficit concentrate their resources on protecting basic metabolism, postponing the energy-demanding symbiosis. At the early stage of drought, the polymer stabilizes the photosynthetic apparatus, improves tissue turgor, and stimulates plant growth, whereas maintaining symbiotic interactions requires its application at a later stress phase. Irrespective of the duration of plant exposure to drought, γ -PGA normalizes osmotic homeostasis, reducing the need for proline accumulation. In addition, it selectively activates antioxidant defense mechanisms, avoiding costly and uncontrolled induction of the entire system. The polymer counteracts the drought-induced increase in guaiacol peroxidase activity while enabling hydrogen peroxide detoxification mainly via ascorbate peroxidase, thereby alleviating oxidative stress and reducing lipid peroxidation. The polymer also induces remodeling of cell wall metabolism associated with the presence of low- and high-methylesterified pectins, arabinans and galactans, xyloglucans and xylogalacturonans, reversing drought-induced changes. This minimizes damage and preserves the structural integrity of nodule cells, particularly in the nitrogen fixation zone, which promotes the maintenance of symbiosis under dehydration. These observations are supported by microscopic analyses of nodule tissue and cellular structure, in which no drought-induced degenerative changes were detected after γ -PGA treatment. The polymer sustains the physiological functionality of these structures, as evidenced by the reversal of the negative impact of stress on the expression of genes crucial for nodule functioning (*LIBOP* and *LILbL*). Application of γ -PGA under drought conditions suppresses excessive activation of stress phytohormone biosynthetic pathways by modulating the expression of their biosynthesis genes (*LIACS*, *LIACO*, *LIZEP*, *LILOX*), which results in altered tissue distribution of the ethylene precursor, abscisic acid, and jasmonic acid. Modification of the distribution of fatty acid amide hydrolase, involved in the catabolism of lipid signaling mediators, in response to γ -PGA indicates the activation of adaptive

mechanisms of lipid homeostasis. At the proteomic level, γ -PGA enhances antioxidant systems, modulates amino acid metabolism, and increases the synthesis of protective compounds, while simultaneously preserving symbiosis and basic metabolic processes.

In summary, by acting at multiple levels through the regulation of redox, phytohormonal, and lipid homeostasis, as well as cell wall remodeling, γ -PGA stabilizes root cell metabolism and enhances the drought tolerance of *L. luteus*.

1. WSTĘP

1.1. Susza w warunkach zmian klimatycznych

1.1.1. Typy, przyczyny oraz trendy występowania suszy w ujęciu globalnym i w Polsce

Najpowszechniejsza klasyfikacja suszy opiera się na naturze czynników ją wywołujących, co pozwala wyróżnić suszę glebową, atmosferyczną oraz hydrologiczną (Farooq i wsp. 2009). Susza glebowa przejawia się deficytem wody w podłożu; susza atmosferyczna wynika z ujemnego bilansu wodnego spowodowanego brakiem opadów, wysokimi temperaturami i niską wilgotnością powietrza. Z kolei susza hydrologiczna stanowi efekt długotrwałego obniżenia stanu wód powierzchniowych, co prowadzi do redukcji poziomu wód gruntowych (Farooq i wsp. 2009; Kuś 2016).

Deficyt wody w glebie, ograniczając dostępność wody w ryzosferze, a co za tym idzie, składników pokarmowych, hamuje wzrost, rozwój i produktywność roślin uprawnych na całym świecie (Chaves i wsp. 2011). Zjawisko to występuje, gdy wilgotność gleby spada do poziomu uniemożliwiającego prawidłowe funkcjonowanie systemu korzeniowego i utrzymanie bilansu wodnego rośliny. Jest to proces złożony, wynikający z interakcji różnych czynników klimatycznych, hydrologicznych, glebowych oraz antropogenicznych, przy czym pierwotną przyczyną pozostaje długotrwały brak opadów względem ewaporacji i transpiracji, co dodatkowo nasilają zmiany klimatyczne (Schmidhuber i Tubiello 2007; Wheeler i Von Braun 2013; Lesk i wsp. 2016). Szczególnie istotne w tym kontekście są wydłużające się okresy bezopadowe oraz fale upałów, które zwiększają ewapotranspirację i przyspieszają przesuszanie gleby. Zgodnie z raportem Międzyrządowego Zespołu ds. Zmian Klimatu (IPCC, ang. *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2023) średnia temperatura powierzchni Ziemi wzrosła o około 1,1°C w porównaniu z epoką przedindustrialną, a dalsze ocieplenie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia suszy. Zmiany te oddziałują nie tylko na bilans wodny gleby, ale modyfikują również fizjologię roślin, skracając okres wegetacyjny oraz redukując plony (Ainsworth i Ort 2010; Asseng i wsp. 2015; Liu i wsp. 2016).

Do czynników antropogenicznych zwiększających ryzyko występowania suszy glebowej zalicza się m.in. emisję gazów cieplarnianych, niewłaściwe praktyki rolnicze oraz zanieczyszczenia przemysłowe (Laishram i wsp. 2012; Dai 2013; Trenberth 2014; Lal 2015; Chataut i wsp. 2023). Emisja dwutlenku węgla, metanu i podtlenku azotu intensyfikuje efekt cieplarniany, prowadząc do wzrostu temperatury i destabilizacji obiegu wody w przyrodzie. Prognozy klimatyczne wskazują, że bez ograniczenia emisji

gazów cieplarnianych oraz wdrożenia działań adaptacyjnych, takich jak poprawa retencji gleb, rozwój odmian roślin tolerancyjnych czy zmiana praktyk agrotechnicznych, problem suszy glebowej będzie narastał w kolejnych dekadach (IPCC 2023). Degradacja struktury gleby, spowodowana nadmierną mechanizacją rolnictwa, monokulturami, erozją czy zanieczyszczeniami chemicznymi, ogranicza jej zdolność do magazynowania wody, co zwiększa podatność roślin na deficyt wilgoci (Lal 2015). Czynniki te mogą również modyfikować właściwości fizykochemiczne gleby, prowadząc do jej zakwaszenia lub zasolenia (Blake i Goulding 2002; Menz i Seip 2004). Akumulacja jonów obniża potencjał osmotyczny roztworu glebowego, wywołując stres, co utrudnia absorpcję wody przez system korzeniowy, a zjawisko to określa się mianem suszy fizjologicznej (Munns i Tester 2008). Dodatkowo zakwaszenie gleby hamuje rozwój systemu korzeniowego, co nasila negatywne skutki deficytu wody (Lal 2015).

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci w wielu regionach świata, szczególnie w strefach umiarkowanych i subtropikalnych, obserwuje się wzrost częstości oraz intensywności epizodów suszy, a modele klimatyczne prognozują, że wraz z dalszym wzrostem temperatury globalnej będą one jeszcze bardziej ekstremalne (Dai 2013; Cook i wsp. 2018). Jednocześnie w rozkładzie opadów obserwuje się większą nieregularność związaną z wydłużaniem okresów bezopadowych oraz intensywnymi, krótkotrwałymi opadami, które nie mogą efektywnie uzupełnić deficytów wody w glebie (IPCC 2023).

W skali globalnej susza dotyka niemal wszystkich kontynentów, jednak jej skutki są szczególnie dotkliwe w Afryce Subsaharyjskiej, południowej Europie, Australii oraz zachodnich regionach Ameryki Północnej. Zgodnie z raportami Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) i IPCC, populacja narażona na suszę systematycznie rośnie, a straty w produkcji rolniczej spowodowane ekstremalnymi zjawiskami pogodowymi nieustannie się zwiększają (Lesk i wsp. 2016; IPCC 2023). Rokowania klimatyczne dla Europy Środkowej przewidują dalszy wzrost temperatury powietrza, skrócenie okresu zalegania pokrywy śnieżnej oraz zmniejszenie retencji wody w glebie w okresie letnim, co może nasilić występowanie suszy glebowej także na terenie naszego kraju (IPCC 2023). Z danych Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej – Państwowego Instytutu Badawczego (IMGW-PIB, 2020) wynika, że od początku XXI wieku wzrasta częstotliwość występowania suszy glebowej, szczególnie w centralnej i zachodniej części Polski. W porównaniu z regionami południowej Europy skala zjawiska w naszym kraju pozostaje umiarkowana, jednak specyfika warunków glebowych, a więc dominacja gleb lekkich o niskiej pojemności wodnej, zwiększa podatność upraw na niedobory opadów

(Krasowicz i wsp. 2011; Zaliwski i wsp. 2012). W latach 2015, 2018 i 2019, podczas letnich epizodów suszy w Polsce, odnotowano jedno z najbardziej dotkliwych strat w historii polskiego rolnictwa, zwłaszcza w produkcji zbóż, kukurydzy oraz roślin okopowych (Kundzewicz i wsp. 2017). Analizy dotyczące wpływu suszy na produkcję *Triticum aestivum* w latach 1961-2019 ujawniły spadki plonów odmian jarych do 19,3% oraz ozimych o 6,3% (Oleksiak i wsp. 2022). Susza glebowa w centralnej Polsce w latach 2005-2016 powodowała drastyczne obniżenie plonów *Zea mays* – średnia produkcja wynosiła ok. 9,1 t ha⁻¹, natomiast w okresach krytycznych spadała do 3,9 t ha⁻¹, co oznaczało redukcję o ~57% względem średniej (Kuśmirek-Tomaszewska i Żarski 2021). Z kolei podczas silnych epizodów suszy meteorologicznej w regionach centralnej Polski zanotowano spadek plonów *Solanum tuberosum* nawet o ponad 50% (Łabędzkiego i Bąka 2017).

1.2. Mechanizmy adaptacyjne roślin do stresu suszy

1.2.1. Odpowiedzi fizjologiczne i biochemiczne

Niedobór wody w glebie obniża potencjał wody w tkankach, inicjując niekorzystne zmiany fizjologiczne, metaboliczne i molekularne. Jednak reakcje rośliny na stres suszy zależą od genotypu, etapu ontogenezy oraz czasu trwania niekorzystnych warunków. Reakcje te obejmują zmiany na poziomie komórkowym, tkankowym oraz systemicznym i prowadzą do zakłócenia cyklu życiowego rośliny od hamowania wzrostu wegetatywnego po zaburzenia reprodukcji (Chaves i wsp. 2003; Ainsworth i Ort 2010; Gupta i wsp. 2020).

Susza wywołuje w roślinie wyraźne zmiany morfologiczne, hamuje wzrost pędów, skraca międzywęzła, przyspiesza starzenie organów oraz redukcję powierzchni liści wynikającą z ograniczenia ekspansji komórek (Blum 2011). Zmniejszenie rozmiarów liści, a co za tym idzie, powierzchni transpiracyjnej, stanowi adaptacyjny mechanizm ograniczający parowanie wody kosztem fotosyntezy (Chenu i wsp. 2018; Khan i wsp. 2022; Li i wsp. 2025). Fundamentalne znaczenie dla tolerancji roślin na stres suszy mają korzenie. Ich tempo wzrostu, liczba korzeni bocznych oraz włóśnikowych i osiągnięte rozmiary decydują o efektywności absorpcji (Ahmad i wsp. 2016). W warunkach stresu spada szybkość transportu wody w korzeniu, a struktura anatomiczna tkanek przewodzących ulega zmianom, m.in. zmniejsza się średnica naczyń ksylemu, odkładane są lignina lub suberyna, co utrudnia dostarczanie wody do części

nadziemnych, prowadząc do utraty turgoru i dalszego hamowania wzrostu (Savi i wsp. 2015).

Deficyt wody podczas fazy generatywnej redukuje liczbę kwiatów, zaburza procesy zapylenia i zapłodnienia, zmniejsza liczbę zawiązków nasion oraz masę ziarna (Tardieu i Tuberosa 2010; Brunet i wsp. 2025). U wielu gatunków roślin uprawnych stres suszy w okresie kwitnienia i tworzenia nasion obniża plon (ang. *yield gap*), m.in. strączkowych i zbożowych (Chaves i wsp. 2003; Wheeler i Von Braun 2013). Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) w Europie w latach 2014–2018 odnotowano spadek plonów u *Lupinus* z 1745,5 do 1447,6 kg ha⁻¹, u *Cicer* z 1021,7 do 765,8 kg ha⁻¹, natomiast u *Triticum* z 4245,0 do 3995,6 kg ha⁻¹. Deficyt wody rzadko powoduje natychmiastową śmierć roślin, raczej wymusza zmianę ich strategii energetycznej i rozwojowej, prowadząc do przedwczesnego wejścia w fazę generatywną w celu przetrwania gatunku, co w rolnictwie skraca czas na gromadzenie cennych asymilatów w ziarniakach, nasionach, bulwach czy innych organach plonotwórczych (Ainsworth i Ort 2010).

Susza stanowi bezpośrednie zagrożenie dla funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Zamknięcie aparatów szparkowych ogranicza asymilację dwutlenku węgla, co obniża intensywność fotosyntezy (Chaves i wsp. 2009; Lawlor i Tezara, 2009). Towarzyszy temu nadmiar energii wzbudzenia w chloroplastach nasilający fotooddychanie (Miller i wsp. 2010). W literaturze zjawiska te opisuje się jako kaskadę ograniczeń od fizycznego zamykania aparatów szparkowych po trwałe uszkodzenia biochemiczne chloroplastów (Farooq i wsp. 2009; Ainsworth i Ort 2010). Skutkiem tego jest intensywna produkcja reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak tlen singletowy (¹O₂), anionorodnik nadadtlenkowy (O₂^{•-}), nadtlenek wodoru (H₂O₂) czy rodnik hydroksylowy (HO[•]) (Asada i wsp. 2006; Gill i Tuteja 2010). Nadprodukcja RFT prowadzi do zachwiania równowagi redoks i przeciążenia systemów antyoksydacyjnych, co skutkuje degradacją białek enzymatycznych, nieodwracalnymi uszkodzeniami kwasów nukleinowych oraz peroksydacją lipidów (Mittler 2002). W warunkach silnego i długotrwałego deficytu wody w roślinie obserwuje się wzrost poziomu produktów peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*), co skutkuje destrukcją struktury dwuwarstwy lipidowej (Droillard i wsp. 1989; Mittler 2002). W warunkach deficytu wody proces ten koreluje z podwyższonym stężeniem dialdehydu malonowego (MDA, ang. *malondialdehyde*), będącego

biomarkerem stresu oksydacyjnego (Gill i Tuteja 2010), a także indukcją aktywności fosfolipazy PLD (ang. *phospholipase*) oraz lipooksygenazy (LOX, ang. *lipoxygenase*) (Sairam i wsp. 1998; Ge i wsp. 2006). Fosfolipaza D katalizuje hydrolizę fosfolipidów błonowych, głównie fosfatydylocholiny, prowadząc do powstania kwasu fosfatydowego (PA) oraz wolnej zasady, np. choliny. Kwas fosfatydowy pełni funkcję wtórnego przekaźnika sygnału i uczestniczy w regulacji odpowiedzi roślin na stres poprzez interakcje z innymi białkami regulatorowymi, takimi jak kinazy SnRK2, (ang. *sucrose non-fermenting related kinase Group2*), fosfatazy PP2C oraz oksydaza NADPH, co prowadzi do kontrolowanej produkcji RFT (Hong i wsp. 2010; Testerink i Munnik 2011). Z kolei LOX katalizuje dioksygenację PUFA, takich jak kwas linolowy (18:2) i linolenowy (18:3), stanowiących substraty do syntezy oksylipin, w tym jasmonianów (JAs, ang. *jasmonates*). Fitohormony te regulują ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres abiotyczny i biotyczny, syntezę białek ochronnych i metabolitów wtórnych, a także uczestniczą w sygnalizacji międzykomórkowej (Feussner i Wasternack 2002; Porta i Rocha-Sosa 2002; Upchurch 2008; Wasternack i Hause 2013).

Lipidowe cząsteczki sygnałowe, takie jak N-acyletanoloamidy (NAE, ang. *N-acylethanolamines*) są zaangażowane w odpowiedź roślin na stres abiotyczny, m.in. suszę, zasolenie czy stres oksydacyjny. Mogą one działać jako modulatory wzrostu i rozwoju, jednak ich nadmierna akumulacja prowadzi do zahamowania elongacji korzeni oraz zaburzeń organizacji cytoszkieletu (Blancaflor i wsp. 2003; Cotter i wsp. 2011). Poziom NAE jest regulowany przez amidową hydrolazę kwasów tłuszczowych (FAAH, ang. *fatty acid amide hydrolase*), której działanie prowadzi do powstania wolnych kwasów tłuszczowych i etanoloaminy. Dotychczasowe doniesienia literaturowe wykazały, że zwiększona aktywność FAAH ogranicza akumulację NAE i łagodzi ich hamujący wpływ na wzrost roślin. U *Arabidopsis thaliana* nadekspresja genu *FAAH* zmniejszała wrażliwość na egzogenne NAE oraz poprawiała wzrost korzeni, szczególnie w warunkach stresowych (Cotter i wsp. 2011). Jednocześnie rośliny z obniżoną aktywnością FAAH wykazywały zwiększoną akumulację NAE i silniejsze zahamowanie wzrostu, co wskazuje na istotną rolę tego enzymu w detoksykacji nadmiaru tych lipidów (Kim i wsp. 2009). Ponadto udowodniono, że FAAH uczestniczy w regulacji odpowiedzi stresowej poprzez interakcje ze szlakami sygnałowymi hormonów roślinnych, w tym kwasu abscysynowego (ABA, ang. *abscisic acid*), oraz sygnałami zależnymi od RFT, co potwierdzono w badaniach nad *A. thaliana*, który poddano działaniu suszy i zasolenia (Teaster i wsp. 2007).

W odpowiedzi na narastający stres oksydacyjny rośliny aktywują złożony system obronny, obejmujący antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne. Pierwszą linię obrony enzymatycznej odgrywa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*), która przekształca $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , podczas gdy katalaza (CAT, ang. *catalase*), peroksydaza askorbinianowa (APX, ang. *ascorbate peroxidase*) oraz peroksydaza gwajakolowa (GWPX, ang. *guaiacol peroxidase*) odpowiadają za detoksykację H_2O_2 (Apel i Hirt 2004). Efektywność tego systemu w warunkach niedoboru wody uznaje się za jeden z głównych wskaźników tolerancji roślin na stres środowiskowy (Wang i wsp. 2009; Ren i wsp. 2016). Strategia nieenzymatyczna opiera się z kolei na biosyntezie i akumulacji niskocząsteczkowych związków ochronnych, takich jak kwas askorbinowy (ASC), α - tokoferol, β -karoten oraz osmolity (Gong i wsp. 2005, Prudnikov 2022). Do ostatniej grupy należą, m.in. cukry (np. sacharoza), alkohole cukrowe (np. mannitol) oraz aminokwasy i ich pochodne (np. prolina, alanina, betaina). Wymienione substancje, choć nie są niezbędne dla przebiegu podstawowych szlaków metabolicznych w optymalnych warunkach dla wzrostu rośliny, to zwiększone ich stężenie stanowi uniwersalny marker odpowiedzi na stres (Kopcewicz 2021). Spośród wymienionych osmoprotektantów kluczową rolę przypisuje się prolinie, która jest syntetyzowana w cytoplazmie lub chloroplastach przez dwa alternatywne szlaki: ornitynowy oraz glutaminianowy, przy czym drugi dominuje w warunkach stresu osmotycznego (Muñoz-Mayor i wsp. 2012; Verbruggen i Hermans 2008). Ma to na celu przede wszystkim obniżenie potencjału wody w komórkach, co umożliwia jej pasywne pobieranie z wysychającego podłoża i w konsekwencji utrzymanie turgoru (Surabhi i wsp. 2003). Skuteczność mechanizmu potwierdzono na poziomie molekularnym. Wyniki badań prowadzonych na *Nicotiana tabacum* wykazały, że transgeniczne linie z nadekspresją genu syntazy Δ^1 -pirolino-5-karboksyłanu (*P5CS*), kluczowego enzymu szlaku glutaminianowego, charakteryzują się wyższym potencjałem osmotycznym liści oraz zwiększoną produkcją biomasy korzeniowej w warunkach deficytu wody (Kavi Kishor i wsp. 1995). Wysoką korelację między poziomem endogennej proliny a odpornością na suszę udokumentowano u wielu gatunków, w tym *Morus alba* (Chaitanya i wsp. 2009), *Sorghum bicolor*, *Catharanthus roseus* oraz *Hordeum vulgare* (Jaleel i wsp. 2007; Surender-Reddy i wsp. 2015; Muzammil i wsp. 2018). Z perspektywy biotechnologii i rolnictwa istotne jest, że aplikacja proliny znacząco podnosi tolerancję na deficyt wody, co zaobserwowano m.in. u *Petunia hybrida* (Yamada i wsp. 2005).

Rola proliny wykracza poza osmoprotekcyjne właściwości. Stabilizuje ona strukturę błon biologicznych, a także dzięki wysokiej hydrofilności chroni makrocząsteczki (białka błonowe i enzymy) przed wywołaną odwodnieniem denaturacją (Kucharska i wsp. 2018). Pełni również funkcję regulatora pH w cytoplazmie oraz bezpośredniego zmiataacza $\text{HO}^\bullet$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$, co podkreśla jej silne właściwości antyoksydacyjne. Ponadto prolina moduluje aktywność enzymatycznych komponentów systemu obronnego, m.in. CAT, POX czy oksydaza polifenolowa (PPO, ang. *polyphenol oxidase*) (Öztürk i Demir 2002). Powyższe doniesienia podkreślają centralną rolę tego aminokwasu w integrowaniu metabolicznych i fizjologicznych odpowiedzi rośliny na niekorzystne zmiany potencjału wody w środowisku.

Kluczową rolę dla regulacji wzrostu oraz adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych odgrywa dynamiczna i metabolicznie aktywna ściana komórkowa. Jej skład i właściwości ulegają modyfikacjom w odpowiedzi zarówno na sygnały endogenne, jak i czynniki egzogenne, takie jak stresy abiotyczne czy biotyczne. Zmiany te wpływają na jej wytrzymałość mechaniczną, integralność strukturalną komórek oraz komunikację międzykomórkową (Daher i Braybrook 2015). Podstawowymi składnikami ściany komórkowej są polisacharydy, wśród których dominują celuloza, hemicelulozy oraz pektyny. Celuloza tworzy szkielet ściany komórkowej w postaci mikrofibrili, nadających wytrzymałość mechaniczną, natomiast hemicelulozy i pektyny wypełniają macierz, regulując właściwości fizykochemiczne (Keegstra i wsp. 2010; Lampugnani i wsp. 2018).

Wpływ suszy na celulozę przejawia się drastycznym ograniczeniem jej biosyntezy. Jest to spowodowane spadkiem turgoru komórek oraz obniżeniem aktywności enzymów z rodziny syntaz celulozy (Le Gall i wsp. 2015; Tenhaken 2015). Stresor ten uruchamia procesy przebudowy struktury ścian komórkowych, które mają na celu zachowanie integralności mechanicznej tkanek w warunkach dehydratacji poprzez modyfikację interakcji między mikrofibrilami celulozy a hemicelulozami, umożliwiając kontrolowane rozluźnienie struktury i minimalizację uszkodzeń podczas kurczenia się komórek. Jednocześnie nasilana jest lignifikacja, która odbywa się kosztem syntezy nowej celulozy, co m.in. zwiększa odporność naczyń ksylemu na kawitację, czyli powstawanie pęcherzyków powietrza blokujących przepływ wody w naczyniach (Chen i wsp. 2022).

Hemicelulozy, wspólnie z celulozą, tworzą sieć strukturalną determinującą elastyczność i stabilność mechaniczną ściany komórkowej. W warunkach deficytu wody

następuje przebudowa tej sieci, polegająca na zmianach w ilości oraz składzie hemiceluloz, co zwiększa sztywność ścian komórkowych i poprawia wytrzymałość tkanek na mechaniczne naprężenia (Le Gall i wsp. 2015; Tenhaken 2015). Istotną rolę w tych procesach odgrywają enzymy modyfikujące macierz polisacharydową, zwłaszcza endotransglikozylazy ksyloglukanowe (XTH, ang. *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase*). Uczestniczą one w przebudowie ksyloglukanów poprzez cięcie i łączenie ich cząsteczek, co rozluźnia sieć celulozowo-ksyloglukanową i wpływa na plastyczność ściany komórkowej. Zmiany te umożliwiają m.in. utrzymanie wzrostu korzeni mimo ograniczonej dostępności wody w ryzosferze (Miedes i wsp. 2014; Le Gall i wsp. 2015).

Szczególne znaczenie w regulacji adhezji komórkowej, spójności tkanek oraz reologicznych właściwości ścian komórkowych przypisuje się pektynom (Willats i wsp. 2001). Stanowią one heterogenną grupę polisacharydów bogatych w kwas galakturonowy, klasyfikowaną na główne typy strukturalne: homogalakturenany (HG), ksylogalakturenany (XGA) oraz ramnogalakturenany typu I i II (odpowiednio RG-I i RG-II) (Burton i wsp. 2010; Voiniciuc i wsp. 2018). Homogalakturenany to najliczniejsza frakcja, stanowiąca około 60–65% całkowitej puli pektyn ściany komórkowej (Wolf i wsp. 2009; Sénéchal i wsp. 2014). Ich struktura, determinowana metylacją czy sieciowaniem jonami wapnia, decyduje o właściwościach mechanicznych oraz procesach wzrostu komórek. Warto również podkreślić, że skład i proporcje poszczególnych frakcji pektyn nie są stałe i zmieniają się w zależności od gatunku rośliny, typu tkanki oraz etapu rozwojowego, modulując tym samym właściwości fizyczne ściany komórkowej, takie jak jej sztywność, elastyczność i zdolność do utrzymania adhezji komórek (Levesque-Tremblay i wsp. 2015; Chebli i Geitmann 2017). Susza wywołuje zmiany w aktywności metyloesteraz pektynowych (PME, ang. *pectin methylesterase*), które uwalniają wolne grupy metylowe z łańcuchów HG (Pelloux i wsp. 2007; Wolf i Greiner 2009). W warunkach niedoboru wody rośliny często zwiększają zawartość demetylowanych pektyn. Proces ten ma dwójakie znaczenie – prowadzi do mechanicznego wzmocnienia ściany komórkowej poprzez wiązanie z jonami wapnia i tworzenie tzw. konfiguracji „egg-box”, które, usztywniając ją, zapobiegają zapadaniu przy niskim turgorze. Drugim mechanizmem jest modulowanie porowatości ściany komórkowej i adhezji między komórkami. Zmiany w poziomie metylacji wpływają na właściwości fizykochemiczne macierzy pektynowej, co może ułatwiać lub ograniczać przepływ wody i sygnałów chemicznych w apoplasmie (Peaucelle i wsp. 2011).

System korzeniowy odgrywa szczególną rolę w determinowaniu tolerancji roślin na suszę, ponieważ odpowiada za absorpcję wody z gleby (Wasaya i wsp. 2018; Ranjan i wsp. 2022). Korzenie odbierają sygnały związane ze zmianą potencjału wody, uruchamiając procesy umożliwiające utrzymanie równowagi w gospodarce wodnej rośliny. W wielu przypadkach wykazują zdolność do stabilizacji zawartości wody w swoich tkankach nawet przy postępującym odwodnieniu części nadziemnej. Zjawisko to obserwowano u *Gossypium hirsutum*, *Vitis vinifera*, *Glycine max* oraz *T. aestivum* (Karademir i wsp. 2011; Intrigliolo i wsp. 2012; Candogan i wsp. 2013; Daryanto i wsp. 2016).

Kluczowym elementem adaptacji roślin do niedoboru wody jest zmiana architektury systemu korzeniowego (RSA ang. *root system architecture*), obejmująca m.in. długość i liczbę korzeni głównych, ich kierunek wzrostu, liczbę korzeni bocznych oraz włosników korzeniowych (Wasaya i wsp. 2018; Ranjan i wsp. 2022). W warunkach suszy wiele gatunków roślin rozwija bardziej rozbudowany system korzeniowy umożliwiający eksplorację głębszych warstw gleby. Wyrastające w głąb korzenie palowe oraz intensywnie rozwijające się korzenie boczne poprawiają efektywność pobierania wody i składników mineralnych (Heng i wsp. 2018). Istotną rolę w adaptacji do suszy odgrywają również cechy morfologiczne pojedynczych korzeni, takie jak ich średnica czy długość włosników. Parametry te wpływają na powierzchnię chłonną korzeni oraz zdolność roślin do pobierania wody z mikroporów glebowych (Wasaya i wsp. 2018).

Susza zaburza przewodnictwo wodne poprzez zmiany aktywności akwaporyn. Białka te umożliwiają szybki i selektywny transport wody, a także mniejszych, nienaładowanych cząsteczek takich jak glicerol czy dwutlenek węgla (Murata i wsp. 2000; Kruse i wsp. 2006). Wyniki badań wskazują, że ekspresja genów kodujących akwaporyny, a także aktywność tych białek ulegają indukcji lub represji w odpowiedzi na stres osmotyczny. Regulacja ta pozwala roślinom optymalizować przepływ wody i minimalizować straty hydrauliczne (Liu i wsp. 2013; Paluch-Lubawa i wsp. 2022; Zupin i wsp. 2022). Ponadto aktywność transkrypcyjna tych genów jest pod ścisłą kontrolą fitohormonów, w szczególności ABA, który jest koordynatorem odpowiedzi roślin w reakcji na deficyt wody (Kim i Sung 2023).

1.2.2. Rola mikroorganizmów ryzosferowych promujących wzrost roślin

Kluczową rolę w strategiach adaptacyjnych roślin do warunków stresowych, w tym suszy, odgrywają bakterie promujące wzrost roślin (PGPR, ang. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), wchodzące w interakcje z rośliną i środowiskiem glebowym, przez co regulują procesy zachodzące w ryzosferze. Mogą one bezpośrednio oddziaływać na metabolizm roślin i ich odpowiedź na stresy abiotyczne, jak i działać pośrednio poprzez zmiany właściwości gleb (Ahemad i Kibret 2014; Backer i wsp. 2018).

Wśród mechanizmów bezpośredniego oddziaływania PGPR na rośliny jednym z istotnych jest zwiększanie dostępności składników mineralnych w glebie (Ahemad i Kibret 2014). Wiele bakterii ryzosferowych posiada zdolność biologicznego wiązania azotu atmosferycznego oraz solubilizacji trudno dostępnych form fosforu, potasu czy cynku, co znacząco poprawia ich biodostępność dla roślin. Do tych korzystnie działających mikroorganizmów zalicza się m.in. *Pseudomonas putida* (Ahemad i Khan 2012a, 2012b, 2012c), *Pseudomonas aeruginosa* (Ahemad i Khan 2011a; Ahemad i Khan 2011b; Ahemad i Khan 2012c), *Rhizobium* sp. (Ahemad i Khan 2010; Ahemad i Khan 2012d), *Bradyrhizobium* sp. (Ahemad i Khan 2011c; Ahemad i Khan 2012d) oraz *Bacillus* sp. (Wani i Khan 2010). Ponadto poprzez immobilizację azotu w biomase bakteryjnej ograniczane są straty tego makroelementu z gleby, co sprzyja efektywniejszemu wykorzystaniu przez rośliny (Parastesh i wsp. 2025).

Bakterie zaliczane do grupy PGPR wykazują zdolność do syntezy lub modulacji poziomu auksyn oraz hormonów stresowych. Szczególnie dobrze poznany jest mechanizm produkcji jednej z auksyn – kwasu indolilo-3-octowego (IAA, ang. *indole-3-acetic acid*). Rośliny wydzielają do ryzosfery prekursor tego związku (L-tryptofan), który może być przekształcany przez bakterie do IAA na drodze kilku szlaków metabolicznych, m.in. poprzez indolo-3-acetamid (IAM, ang. *indole-3-acetamide*), indolo-3-acetonitril (IAN, ang. *indole-3-acetonitrile*) lub indolo-3-pirogronian (IPA, ang. *indole-3-pyruvic acid*). Produkowana przez bakterie auksyna stymuluje rozwój korzeni przybyszowych i bocznych, zwiększając ekspansję włośników, a tym samym powierzchnię chłonną systemu korzeniowego (Spaepen i Vanderleyden 2011; Parastesh i wsp. 2025). Kolejnym mechanizmem wspomaganym przez PGPR jest regulacja poziomu etylenu (ET, ang. *ethylene*) w tkankach roślinnych. W warunkach stresu abiotycznego, np. suszy, zwiększa się endogenna pula tego fitohormonu, który hamuje wzrost korzeni i przyspiesza starzenie tkanek. Wiele szczepów PGPR wykazuje zdolność do syntezy enzymu – deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC, ang. *1-aminocyclopropane-1-*

carboxylic acid), która hydrolizuje prekursor ET (ACC) do amoniaku i α -ketomaślanu (Glick 2014). Proces ten ogranicza biosyntezę ET, co przeciwdziała indukowanym przez stres środowiskowy dysfunkcjom wzrostowym (Parastesh i wsp. 2025).

Mikroorganizmy z grupy PGPR produkują siderofory, które są heterocyklicznymi chelatorami o wysokim powinowactwie do jonów żelaza, dzięki czemu w warunkach ograniczonej dostępności tego pierwiastka możliwe jest jego wiązanie oraz przekształcanie do form łatwo przyswajalnych dla roślin (Ahmed i Holmström 2014). Ponadto żelazo skompleksowane w ten sposób ogranicza jego dostępność dla patogenów, co hamuje ich wzrost, a zatem pośrednio wzmacnia odporność roślin na zakażenie (Parastesh i wsp. 2025).

Mechanizmy odpornościowe aktywowane przez PGPR obejmują także modyfikację transkryptomu. W warunkach stresu uruchamiane są szlaki sygnałowe, m.in. kwasu jasmonowego (JA, ang. *jasmonic acid*) i ET, które powodują wzrost ekspresji genów związanych z reakcją obronną oraz rozwojem systemu korzeniowego i są elementem mechanizmu indukowanej odporności systemicznej (ISR, z ang. *induced systemic resistance*) (Pieterse i wsp 2014; Parastesh i wsp. 2025).

1.3. Rośliny strączkowe

1.3.1. Znaczenie gospodarcze i środowiskowe

Motylkowate (*Fabaceae* L.) stanowią jedną z najważniejszych rodzin roślin uprawnych na świecie, odgrywając istotną rolę zarówno w produkcji rolniczej, jak i w funkcjonowaniu zrównoważonych agroekosystemów. Ich znaczenie wynika z wysokiej wartości odżywczej nasion, szerokiego wykorzystania w produkcji pasz oraz unikalnej zdolności do biologicznego wiązania azotu atmosferycznego, co poprawia żyzność gleby i minimalizuje zapotrzebowanie na syntetyczne nawozy mineralne (Prusiński i Borowska 2002; Graham i Vance 2003; Stacey i wsp. 2006; Lu i Chen 2024).

Z gospodarczego punktu widzenia rośliny motylkowate są cennym źródłem białka wykorzystywanego w żywieniu ludzi i zwierząt. Nasiona gatunków, takich jak *G. max*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* czy *Lens culinaris*, zawierają od około 20 do 40% białka, predestynując je do roli kluczowego elementu diety w wielu regionach świata. Z tego względu stanowią ważny surowiec dla przemysłu spożywczego i paszowego, wykorzystywany w produkcji wysokobiałkowych koncentratów i pasz. W hodowli zwierzęcej szczególne znaczenie mają gatunki pastewne, takie jak *Medicago* czy

Trifolium, które przy zachowaniu dobrej strawności pasz optymalizują wartość pokarmową oraz produktywność zwierząt gospodarskich (Kebede 2017; Huang 2024).

Istotną rolę gospodarczą roślin motylkowatych należy także rozpatrywać w kontekście zwiększania efektywności agroekosystemów. Ich włączenie w formie przedplonów poprawia produktywność roślin następczych. Wynika to z poprawy dostępności i kumulacji składników pokarmowych w glebie oraz efektywniejszego wykorzystania zasobów środowiska w systemach zróżnicowanych w odniesieniu do monokultur (Hauggaard-Nielsen i wsp. 2008; Kebede 2017). Obecność roślin motylkowatych w agroekosystemach wpływa korzystnie na właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne gleby. Rozwinięty system korzeniowy oraz resztki poźniwne przyczyniają się do zwiększenia zawartości materii organicznej w glebie i ulepszenia jej struktury. Ponadto system korzeniowy tych roślin sprzyja aeracji gleby i poprawia jej zdolność do retencji wody, co okazuje się nieocenione przy intensywnym użytkowaniu rolniczym (Wolkaro i Tesfaye 2025). Rośliny motylkowate odgrywają zatem ważną rolę w kształtowaniu bioróżnorodności ekosystemów rolniczych, minimalizując jednocześnie degradację środowiska spowodowaną intensywną produkcją rolniczą. Włączenie ich do płodozmianu stymuluje aktywność mikroflory glebowej i redukuje emisję gazów cieplarnianych związanych z produkcją i aplikacją nawozów azotowych (Kebede 2017; Huang 2024).

Najbardziej charakterystyczną cechą tych roślin pozostaje zdolność do symbiozy z bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Rhizobium*, umożliwiającą redukcyjne wiązanie azotu atmosferycznego. W procesie tym azot cząsteczkowy z powietrza zostaje przekształcony do przyswajalnej dla roślin formy – amoniaku. Proces ten nie tylko zaspokaja zapotrzebowanie na azot samej rośliny motylkowej, lecz także wzbogaca pulę przyswajalnej formy tego pierwiastka w ryzosferze dla innych gatunków (Kebede 2017). Szacuje się, że efektywność symbiozy oscyluje między 100-300 kg azotu na hektar rocznie, co znacząco ogranicza zależność od mineralnych źródeł azotu (Yeremko i wsp. 2025).

1.3.2. Symbioza z bakteriami brodawkowymi

Wiązanie azotu atmosferycznego przez rośliny motylkowate zachodzi w brodawkach korzeniowych, które są wyspecjalizowanymi strukturami powstającymi z komórek kory korzeniowej dzięki interakcjom z wolnożyjącymi bakteriami

ryzosferowymi *Rhizobium/Bradyrhizobium* (Fernández-Pascual i wsp. 2007). W zainfekowanych komórkach bakterie są otoczone błoną pochodzenia roślinnego, tworzącą nową strukturę – symbiosom (Oldroyd 2013). W symbiosomie bakterie przekształcają się do form endosymbiotycznych (bakteroidów), które wiążą azot atmosferyczny dzięki działaniu nitrogenazy, wymagającej niskiego, lecz stabilnego stężenia tlenu, które jest regulowane barierą dyfuzyjną gazu oraz wymuszonym przepływem zapewnionym przez leghemoglobinę (Kunert i wsp. 2016). Działanie mikroorganizmów generuje amoniak, który jest wykorzystywany przez roślinę do biosyntezy glutaminy i kwasu glutaminowego, wspierających syntezę biogennych cząsteczek, takich jak białka i kwasy nukleinowe, przyczyniając się do wzrostu biomasy (Gresshoff i wsp. 2015; Kunert i wsp. 2016).

Proces nodulacji jest kontrolowany zarówno przez sygnały bakteryjne, jak i mechanizmy regulacyjne rośliny gospodarza, przy czym kluczową rolę odgrywają bakteryjne czynniki nodulacyjne, określane jako Nod (ang. *Nod factors*). Pierwszym etapem symbiozy jest chemiczna komunikacja pomiędzy rośliną a mikroorganizmami. Przy ograniczonej dostępności azotu w podłożu rośliny wydzielają do ryzosfery związki organiczne, głównie flawonoidy i betainy, działające jako chemoatraktanty dla bakterii symbiotycznych. Substancje te indukują ekspresję genów *nod* w rizobiach poprzez aktywację regulatorowego białka NodD (Dakora i Phillips 2002; Jones i wsp. 2007; Oldroyd i Downie 2008). Białko to wiąże się z sekwencjami w regionach promotorów genów brodawkowania (*nod*), stymulując ich transkrypcję. Gen *nodD* wyróżnia się wśród genów nodulacyjnych konstytutywną ekspresją zarówno w wolno żyjących komórkach bakterii glebowych, jak i podczas symbiozy z rośliną gospodarzem (Rossen i wsp. 1985; Spaink i wsp. 1987). Aktywacja genów *nod* prowadzi do syntezy cząsteczek sygnałowych – czynników Nod, czyli lipochitooligosacharydów o złożonej strukturze chemicznej, które pełnią funkcję sygnałów molekularnych inicjujących symbiozę. Ich specyficzność determinuje kompatybilność pomiędzy określonym szczepem bakterii a gatunkiem rośliny motylkowatej. Rozpoznanie czynników Nod przez receptory roślinne zlokalizowane w komórkach epidermy korzenia uruchamia szlak transdukcji sygnału prowadzący do przemian tkanek korzenia. Jedną z pierwszych reakcji jest depolaryzacja błony komórkowej oraz krótkotrwały napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy, co indukuje reorganizację cytoszkieletu aktynowego oraz deformację włóśniaków korzeniowych, stanowiąc początek infekcji bakteryjnej (Ehrhardt i wsp. 1996; Felle i wsp. 1999; Oldroyd i Downie 2008; Oldroyd 2013). Szlak sygnałowy indukowany przez czynniki Nod

aktywuje wczesne (*ENOD*, ang. *Early Nodulin*) oraz późne geny nodulinowe (*NOD*), pełniące odmienne funkcje w procesie powstawania brodawek. Wczesne geny nodulinowe ulegają ekspresji w pierwszych godzinach po infekcji bakteryjnej, inicjując podziały komórkowe w tkankach korzenia oraz powstawanie nici infekcyjnych. Do tej grupy należą m.in. *ENOD12*, *ENOD5* oraz *RIP1* (ang. *RHIZOBIUM-INDUCED PEROXIDASE 1*), kodujący peroksydazę indukowaną przez rizobia (Nap i Bisseling 1990; Pichon i wsp. 1992; Oldroyd i Downie 2008). W kolejnych etapach nodulacji aktywowane są późne geny nodulinowe, których ekspresja następuje bezpośrednio przed rozpoczęciem lub podczas wiązania azotu. Geny te kodują m.in. grupę prostetyczną leghemoglobiny, a także białka uczestniczące w funkcjonowaniu dojrzałych brodawek korzeniowych, w tym w regulacji metabolizmu azotu oraz utrzymaniu odpowiednich warunków dla aktywności nitrogenazy (Nap i Bisseling 1990; Verma i wsp. 1992; Ott i wsp. 2005).

Efektywność symbiozy, w tym aktywność nitrogenazy, zależy od wielu czynników środowiskowych, m.in. dostępności wody (Serraj i wsp. 1999), temperatury (Stępkowski i wsp. 2007; Gavelienė i wsp. 2022), pH gleby (Tang i Robson 1993) oraz obecności odpowiednich szczepów bakterii symbiotycznych (Prusiński i wsp. 2012, 2017a, 2017b). Niedobór wody w podłożu ogranicza dopływ asymilatów z nadziemnych części rośliny oraz zakłóca działanie leghemoglobiny, w wyniku czego dochodzi do wzrostu przepuszczalności brodawek dla tlenu, a w konsekwencji obniżenia aktywności nitrogenazy (González i wsp. 2015). Spadek turgoru liści redukuje przepływ wody we floemie utrudniając transport produktów wiązania azotu (Qiao i wsp. 2024). Skutkuje to akumulacją ureidów i aminokwasów w tkankach korzenia, zaburzając aktywność brodawek korzeniowych jeszcze przed inhibicją fotosyntezy (Liu i wsp. 2018). Sprawia to, że wiązanie azotu jest najbardziej wrażliwym na suszę procesem fizjologicznym zachodzącym u roślin strączkowych.

Podwyższona temperatura, ponad optymalną dla nodulacji $\sim 21^{\circ}\text{C}$, wywiera negatywny wpływ na proces symbiozy u *Lupinus*, prowadząc do znacznego zmniejszenia liczby oraz masy brodawek korzeniowych (Fernández-Pascual i wsp. 1996). Stres termiczny zaburza również aktywność nitrogenazy, co przejawia się zmniejszeniem intensywności wiązania azotu atmosferycznego i skutkuje zredukowaną zawartością tego pierwiastka w tkankach. Wysokie temperatury ograniczają transport asymilatów z pędu do korzeni, pozbawiając bakterie symbiotyczne niezbędnej energii do przeprowadzania redukcji azotu atmosferycznego. W rezultacie roślina traci zdolność do

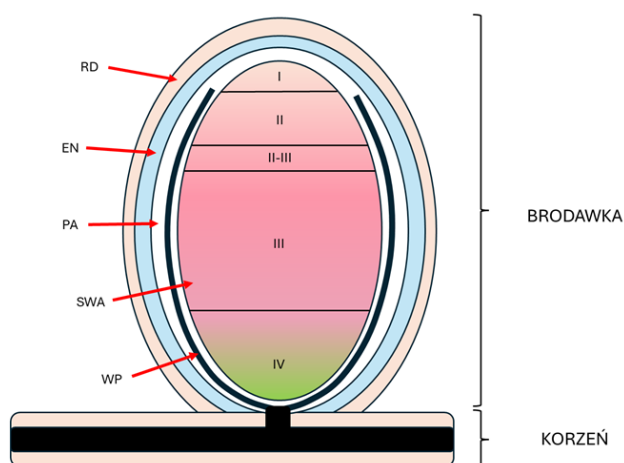
samowystarczalności w kwestii gospodarki azotowej, co pogarsza jej ogólny stan fizjologiczny i hamuje przyrost biomasy (Keerio 2001; Liu i wsp. 2018; Jumrani i wsp. 2024).

Zwiększenie wartości pH środowiska glebowego powyżej 6 redukuje liczbę oraz masę powstających brodawek korzeniowych, hamuje wzrost korzeni bocznych, a przez to ogranicza liczbę miejsc infekcji dostępnych dla bakterii *Bradyrhizobium* (Tang i Robson 1993). Ponadto w warunkach podwyższonego pH spada dostępność żelaza koniecznego dla syntezy leghemoglobiny w brodawkach i stanowiącego kofaktor nitrogenazy. Powyższe modyfikacje ostatecznie prowadzą do niewystarczającego zaopatrzenia w azot (Briat i wsp. 2015).

Inokulacja nasion szczepami *Bradyrhizobium lupini* znacząco zwiększa liczbę i biomasę brodawek korzeniowych, szczególnie na glebach uboższych w autochtoniczne populacje rizobiów. Obecność efektywnie działających szczepów bezpośrednio przekłada się na wyższą aktywność nitrogenazy, co intensyfikuje wiązanie azotu atmosferycznego i poprawia status azotowy rośliny. Prawidłowy dobór szczepów bakterii specyficznych dla genotypu (ang. *host-specificity*) stabilizuje symbiozę nawet w niesprzyjających warunkach, generując wyższą biomasę wegetatywną i plon. Wówczas rośliny następcze mogą uzupełnić swoje zapotrzebowanie na azot mineralny, co optymalizuje koszty produkcji i wspiera uprawę strączkowych (Prusiński i wsp. 2012; Prusiński 2017a, 2017b).

Brodawki korzeniowe *Lupinus luteus* reprezentują typ nieokreślony (ang. *indeterminate nodules*), nazywane są litymi lub lupinoidalnymi i są charakterystyczne dla wielu przedstawicieli podrodziny *Faboideae* (Hirsch i Sprent 2002) (Schemat 1).

W przeciwieństwie do kulistych brodawek korzeniowych typowych dla *Pisum* czy *Phaseolus*, brodawki *Lupinus* wykazują unikalną morfologię: są zazwyczaj płaskie, szerokie i otaczają korzeń, tworząc zgrubienia w formie pierścieni lub kołnierzy. Obecność tkanki merystematycznej umożliwia im powiększanie rozmiarów (Jasińska i Kotecki 1994; Łotocka i wsp. 2000; Hirsch i Sprent 2002; González-Sama 2004). Najintensywniejszy rozwój i aktywność metaboliczną obserwuje się na korzeniu głównym, co zapewnia optymalny transport amoniaku, ureidów i glutaminianu do nadziemnych części rośliny (Jasińska i Kotecki 1994; González-Sama 2004).



Schemat 1. Schemat brodawki korzeniowej nieokreślonej. I – merystem, II – strefa prefiksacji, II–III – strefa wczesnej symbiozy, II–III, III – strefy wiązania azotu, IV – strefa starzenia. Skróty: RD – ryzoderma, EN – endoderma, PA – parenchyma, SWA – strefa wiązania azotu, WP – wiązki przewodzące. Na podstawie Hirsch (1992), Pawłowski i Bisseling (1996), Luyten i Vanderleyden (2000), zmodyfikowane.

1.3.3. Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) jako obiekt badań

Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) jest gatunkiem rośliny strączkowej o kluczowym znaczeniu gospodarczym w Polsce, Europie Zachodniej, krajach basenu Morza Śródziemnego, Australii oraz Afryce Południowej. W warunkach Europy Środkowej stanowi on ważny element produkcji białka paszowego. Nasiona *L. luteus* wyróżniają się wyjątkowo dużą, ponad 40% zawartością białka bogatego w lizynę, przy niskim poziomie substancji antyżywnościowych, w tym alkaloidów. To sprawia, że gatunek ten ma olbrzymie znaczenie praktyczne i jest wykorzystywany jako pasza dla monogastycznych zwierząt hodowlanych (Kapusta 2012; Hanczakowska i Księżak 2012). Korzystny skład aminokwasowy, a także wysoka jakość paszowa łubinu sprawiają, że może on stanowić doskonałą alternatywę dla importowanej śrutu sojowej (Podleśny 2005). Zwiększenie powierzchni upraw łubinu może także przyczynić się do redukcji nakładów finansowych związanych z importem tego surowca oraz podnieść próg rentowności jego produkcji.

Znaczenie łubinu wykracza jednak poza jego wartość paszową. Gatunek ten cieszy się zainteresowaniem, ponieważ wpisuje się w ideę zrównoważonego rolnictwa, poprawiając strukturę gleby, zwiększając jej aktywność biologiczną, wzbogacając ją w azot oraz redukując nakłady finansowe związane z dodatkowym nawożeniem. Szacuje się, że *L. luteus* może pozostawić w glebie nawet 150–200 kg azotu ha⁻¹. Wśród gatunków motylkowatych łubin ma najniższe wymagania glebowe, gdyż toleruje gleby lekkie, piaszczyste, o kwaśnym odczynie. Jest on wysiewany w czystym siewie lub w

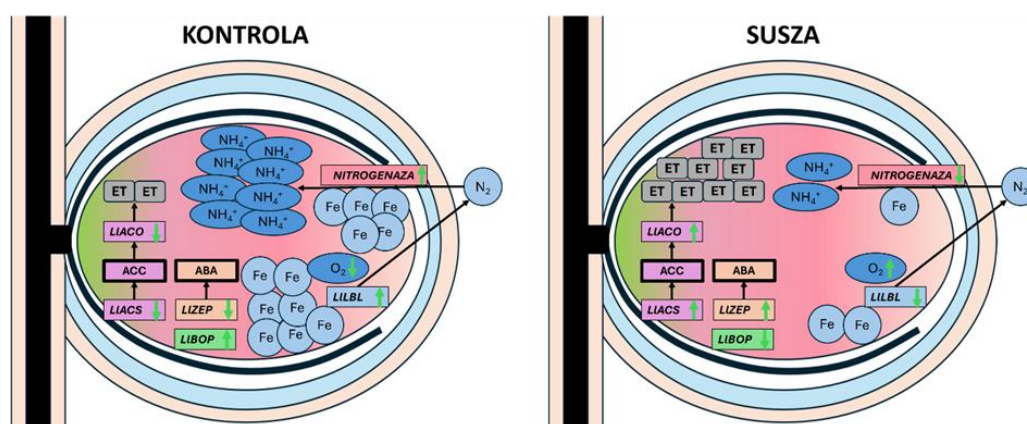
mieszkankach jako plon główny na nasiona, a także znajduje zastosowanie w siewie poplonowym z przeznaczeniem na zieloną masę. *L. luteus* przyczynia się do poprawy produktywności gleby, co sprzyja uzyskiwaniu wyższych plonów roślin następczych, czyniąc go wartościowym elementem w płodozmianie (Peoples i wsp. 2009; Gacek 2012).

Pomimo licznych zalet agronomicznych i żywieniowych, powierzchnia uprawy *L. luteus* w Polsce pozostaje ograniczona (Florek i wsp. 2012). Według danych Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa (ARiMR) oraz Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU), w 2024 r. areał ten był stosunkowo niewielki i wynosił około 12,5 tysięcy ha, stanowiąc ułamek całkowitej produkcji strączkowych (Kaliska i wsp. 2024). Głównym czynnikiem limitującym jego ekspansję pozostaje wysoka wrażliwość na stres suszy glebowej. Gatunek ten wykazuje szczególną wrażliwość na suszę w okresie rozwoju generatywnego, w którym niedobór wody indukuje masowe, przedwczesne opadanie kwiatów (Pigeaire i wsp. 1992). Na pierwszym piętrze kwiatostanu może opadać do 60% kwiatów, na drugim niemal 90%, natomiast na wyższych piętrach często dochodzi do całkowitej redukcji tych organów. Skala tego zjawiska przekłada się bezpośrednio na spadek liczby zawiązanych strąków i nasion, a tym samym generuje straty ekonomiczne (Prusiński i Borowska 2002). Szczególną podatność na suszę wykazuje system korzeniowy łubinu. Choć gatunek ten wytwarza silnie rozwinięty korzeń palowy, który w optymalnych warunkach eksploruje głębsze warstwy gleby, to jednak susza hamuje jego wzrost, redukuje rozwój korzeni bocznych i włośników, zmniejszając powierzchnię chłonną, a przez to absorpcję wody (Palta i wsp. 2003).

Deficyt wody wpływa również negatywnie na proces nodulacji u *L. luteus*, ograniczając inicjację brodawek korzeniowych, ich liczbę oraz aktywność nitrogenazy, co prowadzi do spadku efektywności biologicznego wiązania azotu (Serraj 2003). Susza glebowa u *L. luteus* uruchamia także kaskadę reakcji hormonalnych, w których kluczową rolę odgrywają fitohormony stresowe – ABA i ET oraz jego bezpośredni prekursor (ACC). Pod wpływem stresu suszy dochodzi do wzrostu ekspresji genu *LIZEP* (ang. *zeaxanthin epoxidase*), kodującego epoksydazę zeaksantyny (Wilmowicz i wsp. 2020). Enzym ten katalizuje kluczowy, często limitujący etap biosyntezy ABA polegający na epoksydacji zeaksantyny i anteraksantyny do wiolaksantyny i bierze udział w odpowiedzi na stresy środowiskowe. Podwyższoną aktywność transkrypcyjną *ZEP* zaobserwowano w korzeniach *A. thaliana* poddanych odwodnieniu (Bray 2002).

Susza glebowa moduluje również szlak biosyntezy ET, który, podobnie jak ABA, może promować starzenie się brodawek korzeniowych (Van de Velde i wsp. 2006; Guinel 2015). W szlaku biosyntezy ET biorą udział bezpośredni prekursor (ACC) oraz syntaza ACC (ACS, ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase*) i oksydaza ACC (ACO, ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*). Badania przeprowadzone na brodawkach korzeniowych *L. luteus* wykazały, że deficyt wody w glebie stymuluje ekspresję obu genów (*LIACS* i *LIACO*) oraz prowadzi do akumulacji ACC, czemu towarzyszy stopniowy spadek zawartości żelaza, co bezpośrednio upośledza funkcjonowanie brodawek (Wilmowicz i wsp. 2020).

Poza fitohormonami w rozwoju korzeni oraz brodawek korzeniowych kluczową rolę odgrywają białka BLADE-ON-PETIOLE (BOP) (Khan i wsp. 2014). Wyniki badań prowadzonych na mutantach *Medicago truncatula* i *P. sativum* z defektami w genach *NODULE ROOT* i *COCHLEATA*, będących ortologami *AtBOP*, wykazały występowanie nieprawidłowości w rozwoju, m.in. deformacje występujące w wierzchołkowej części brodawek (Couzigou i wsp. 2012). Dotychczas zidentyfikowano i scharakteryzowano gen *LIBOP* także u *L. luteus* (Frankowski i wsp. 2015). Jego najwyższa ekspresja przypada na etap aktywnego wzrostu i różnicowania brodawek korzeniowych, co sugeruje udział *LIBOP* w ich organogenezie. Autorzy wykazali korelację pomiędzy aktywnością transkrypcyjną tego genu a ekspresją genu kodującego leghemoglobinę (*LILb1*), co wskazuje na jego istotną rolę podczas tworzenia optymalnych warunków dla symbiozy z bakteriami. Skutkiem opisywanych molekularnych i hormonalnych procesów jest ograniczenie wiązania azotu (Wilmowicz i wsp. 2020) (Schemat 2).



Schemat 2. Hipotetyczny model funkcjonowania brodawek korzeniowych *L. luteus* w warunkach suszy. Na podstawie Wilmowicz i wsp. (2020), zmodyfikowane.

Wysoka wrażliwość *L. luteus* na stres suszy glebowej, zwłaszcza w kontekście funkcjonowania systemu korzeniowego i symbiozy z bakteriami brodawkowymi, stanowi obecnie najważniejsze ograniczenie jego uprawy. W warunkach prognozowanego wzrostu częstotliwości i intensywności epizodów suszy, problem ten może ulegać dalszemu zaostrzeniu, co podkreśla pilną potrzebę prowadzenia intensywnych badań nad mechanizmami tolerancji stresu suszy u tego gatunku.

1.4. Biologiczne metody łagodzenia stresu

1.4.1. Biopolimery

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie biologicznymi metodami łagodzenia tych stresów abiotycznych, w tym wykorzystaniem naturalnych związków jako efektywnego narzędzia wspomagającego adaptację roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. Szczególną uwagę poświęca się biopolimerom, które dzięki unikalnym właściwościom fizykochemicznym wpływają na metabolizm roślin, poprawiają właściwości gleby oraz wzmacniają interakcje symbiotyczne w ryzosferze. Biopolimery mogą działać na dwa sposoby, jako stymulatory wzrostu roślin i/lub induktory systemicznych mechanizmów obronnych uruchamianych w odpowiedzi na stres (El Hadrami i wsp. 2010; Malerba i Cerana 2016). Jednym z najlepiej zbadanych biopolimerów stosowanych w rolnictwie jest chitozan. Wykazano, że jego aplikacja w warunkach niedoboru wody zwiększa zawartość chlorofilu w liściach oraz poprawia efektywność fotosyntezy oraz, wzmacniając aktywność SOD, CAT i POX, jednocześnie zmniejsza stres oksydacyjny (Farouk i Amany 2012; Hidangmayum i wsp. 2019).

Istotną rolę w przeciwdziałaniu negatywnym skutkom stresów środowiskowych odgrywają także alginiany, będące polisacharydami pozyskiwanymi ze ścian komórkowych brunatnic. Związki te są często wykorzystywane jako składniki hydrożeli lub nośniki mikroorganizmów ryzosferowych. Alginianowe kapsułki umożliwiają skuteczną immobilizację bakterii PGPR, która korzystnie wpływa na ich przeżywalność w glebie oraz zwiększa kolonizację ryzosfery. Jednocześnie alginiany, mając zdolność do zatrzymywania wody, poprawiają właściwości fizyczne podłoża (Bashan i wsp. 2014).

Inną grupę biopolimerów wspomagających adaptację roślin do stresów abiotycznych stanowią produkowane przez mikroorganizmy glebowe egzopolisacharydy, które odgrywają rolę w kształtowaniu struktury gleby i zwiększają tolerancję roślin na suszę poprzez poprawę retencji wody w ryzosferze i tworzenie ochronnej, hydrofilowej

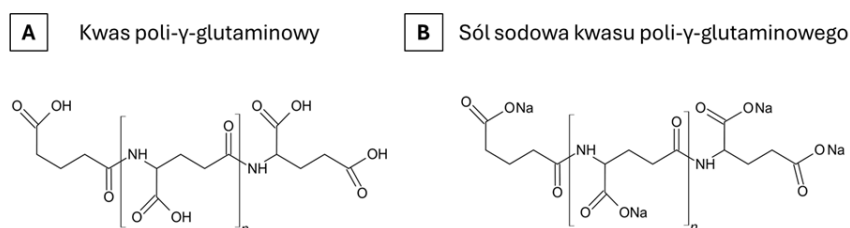
mikrosfery wokół korzeni (Naseem i Bano 2014). Ponadto mają zdolność do agregacji cząstek glebowych, co poprawia porowatość podłoża i dostępność wody dla systemu korzeniowego (Costa i wsp. 2018).

1.4.1.1. Kwas poli γ -glutaminowy (γ -PGA)

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzi kwas poli- γ -glutaminowy (γ -PGA). Zidentyfikowano go po raz pierwszy w 1937 r. w otoczce bakterii *B. anthracis* (Ivannovics i Bruckner 1937), a po kilku latach określono jego strukturę chemiczną (Hanby i Rydon 1946). Odkrycie to zapoczątkowało systematyczne badania nad występowaniem i funkcją tego biopolimeru w bakteriach *Bacillus*. Z czasem okazało się, że naturalnymi źródłami γ -PGA są tradycyjne fermentowane produkty sojowe Azji Wschodniej: japońskie natto wytwarzane przez *B. subtilis* subsp. *natto* oraz koreański chungkookjang fermentowany z udziałem *B. subtilis* (Hara i Ueda 1982; Ashiuchi i wsp. 2001). Następnie wykazano, że zdolność do syntezy γ -PGA posiadają także inne gatunki, m.in. bakterie *B. licheniformis* (Luo i wsp. 2016), wykorzystywane obecnie w procesach fermentacyjnych o znaczeniu przemysłowym. Liczne badania potwierdzają, że bakterie z rodzaju *B. subtilis* syntetyzują γ -PGA w różnych warunkach środowiskowych, szczególnie przy ograniczonej dostępności składników odżywczych, np. niskim poziomie węgla i azotu, a także pod wpływem innych stresów, np. osmotycznych (Luo i wsp. 2016; Dong i Hu 2024). Jego biosynteza zachodzi głównie na początku fazy stacjonarnej wzrostu mikroorganizmów, co wskazuje na adaptacyjną rolę biopolimeru w metabolizmie, przetrwaniu komórek i kolonizacji ryzosfery (Lazazzera 1999; Kimura i wsp. 2004).

Kwas poli- γ -glutaminowy to homopolimer składający się z reszt kwasu glutaminowego (Shi i wsp. 2007). W przeciwieństwie do typowych białek, w których aminokwasy łączą się wiązaniami α -peptydowymi, γ -PGA tworzą jednostki kwasu D- i L-glutaminowego połączone wiązaniami amidowymi między grupami α -aminowymi a γ -karboksylowymi (Bajaj i Singhal 2009). Właściwości hydrofilowe γ -PGA determinowane są obecnością grup karboksylowych, które tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, co w praktyce rolniczej zwiększa pojemność wodną roztworu glebowego i jej dostępność dla roślin (Shi i wsp. 2007). Ze względu na złożoność procesu pozyskiwania naturalnego γ -PGA z bakterii *Bacillus*, który wymaga prowadzenia procesów fermentacyjnych w bioreaktorach lub enzymatycznej polimeryzacji, często w

badaniach wykorzystywana jest komercyjnie dostępna sól sodowa γ -PGA. Różnice strukturalne pomiędzy związkami przedstawiono na **Schemacie 3**.



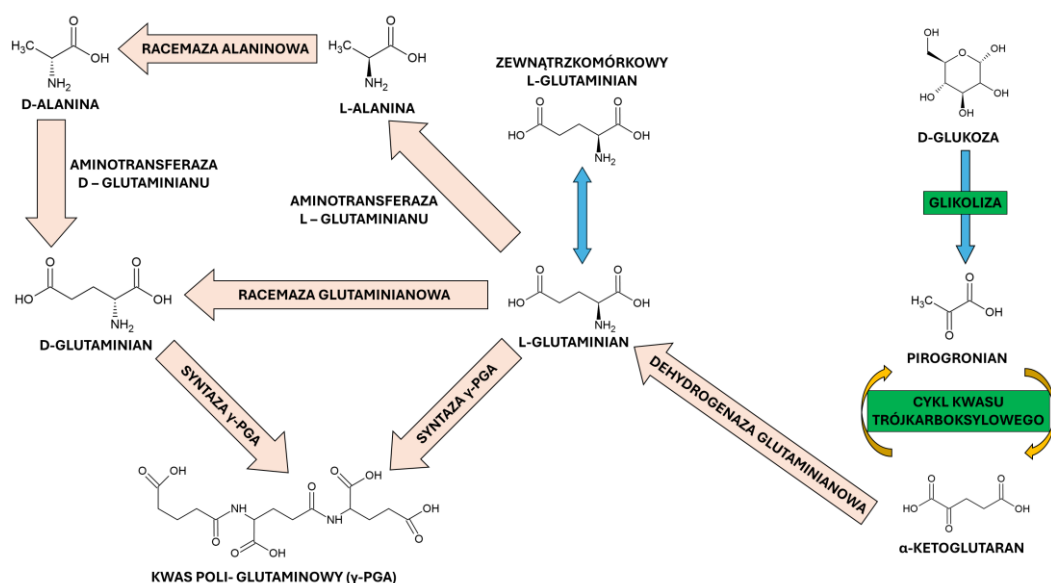
Schemat 3. Struktura chemiczna kwasu poli- γ -glutaminowego (A) oraz jego soli sodowej (B).

Kwas poli- γ -glutaminowy charakteryzuje się wyjątkową zdolnością zagęszczania roztworów wodnych oraz wiązania metali, zarówno odżywczych dla roślin (wapń, magnez, żelazo, mangan, potas), jak i toksycznych (ołów, kadm, miedź, nikiel, cynk, chrom, rtęć) (Candela i Fouet 2006; Ashiuchi i wsp. 2010). Wyniki badań prowadzonych na *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Pennisetum americanum*, *Pennisetum purpureum* oraz *Cosmos sulphureus* wskazują, że γ -PGA może wiązać lub immobilizować kadm, ołów, chrom i cynk, ograniczając ich pobieranie i translokację do żywych organizmów (Pang i wsp. 2018; Wang i wsp. 2020; Liang i wsp. 2025). Istnieją doniesienia wskazujące, że γ -PGA zwiększa u roślin przyswajalność azotu i poprawia dostępność tego makroelementu w glebie poprzez wzmocnienie aktywności ureazy i mikroorganizmów odpowiedzialnych za jego symbiotyczne wiązanie (Xu i wsp. 2013).

Masa cząsteczkowa γ -PGA waha się od 100 kDa do 2500 kDa, a stosunek izomerów D- i L-glutaminianu zależy od szczepu bakteryjnego i warunków biosyntezy (Najar i Das 2015). W roztworze wodnym biopolimer przyjmuje konformację lewoskrętnej helisy stabilizowanej wiązaniami wodorowymi (Zanuy i Aleman 2007), jednak jego konformacja ściśle zależy od warunków fizykochemicznych, zwłaszcza stężenia tego związku oraz pH podłoża, na co wskazują wyniki badań prowadzonych u *B. licheniformis*. Przy niskim stężeniu (0,1% w/v) i $\text{pH} < 7,0$ dominującą strukturą są α -helisy, natomiast w wyższym stężeniu i $\text{pH} > 7,0$ przeważa konformacja β -harmonijki. Wzrost pH sprzyja deprotonacji grup karboksylowych, prowadząc do ekspozycji ujemnych ładunków COO^- w cząsteczce γ -PGA i zwiększenia jego zdolności do oddziaływań elektrostatycznych (He i wsp. 2000). Zmienność ta świadczy o wysokiej plastyczności strukturalnej γ -PGA, umożliwiającej celowe modulowanie jego

właściwości funkcjonalnych, w tym zdolności do wiązania wody i selektywnej chelatacji kationów. Jednocześnie biopolimer ten zachowuje stabilność w szerokim zakresie mas cząsteczkowych, co dodatkowo podkreśla jego uniwersalne znaczenie aplikacyjne (He i wsp. 2000, Najar i Das 2015).

Podstawowym substratem biosyntezy γ -PGA w komórkach *B. subtilis* i *B. anthracis* jest L-glutaminian, który może pochodzić ze źródeł endogennych lub egzogennych. W komórce powstaje on dwoma głównymi szlakami metabolicznymi. Pierwszy wykorzystuje cykl kwasu trikarboksylowego, w którym glukoza i pirogronian ulegają przekształcaniu do α -ketoglutaranu, który następnie jest redukowany do L-glutaminianu. Drugi szlak angażuje zewnątrzkomórkowy L-glutaminian syntetyzowany z α -ketoglutaranu i siarczanu amonu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową (w warunkach niedoboru glutaminy) lub syntetazę glutaminową i aminotransferazę glutaminowo-2-oksoglutaranową (w obecności L-glutaminy) (Bajaj i Singhal 2009). Zwiększenie puli L-glutaminianu w komórce sprzyja produkcji γ -PGA. Istotnym etapem jest racemizacja L-glutaminianu do D-glutaminianu. Proces ten zachodzi pośrednio, wówczas L-glutaminian przekształcany jest w L-alaninę przez aminotransferazę L-glutaminianowo-pirogronianową, która z kolei ulega konwersji do D-alaniny katalizowanej przez racemazę alaninową (Goto i Kunioka 1992; Ashiuchi i wsp. 1999; Shih i wsp. 2005). Ostatecznie zarówno L- jak i D-glutaminian są polimeryzowane do γ -PGA przez kompleks enzymatyczny PGSSCA (np. racemaza glutaminianowa i polimeraza γ -PGA), kodowany przez klaster genowy *pgsBCA* (Ashiuchi i wsp. 1999; Ashiuchi i wsp. 2003; Candela i wsp. 2005; Ashiuchi 2010; Wang i wsp. 2017). Wszystkie opisane szlaki biosyntezy γ -PGA przedstawiono na Schemacie 4. Produkcja syntetycznego γ -PGA pozostaje procesem kosztownym i technicznie bardziej złożonym niż wytwarzanie konwencjonalnych polimerów chemicznych. Dlatego istotne znaczenie ma dogłębne poznanie mechanizmów biosyntezy, co umożliwi racjonalne projektowanie ulepszonych szczepów produkcyjnych o podwyższonej wydajności i obniżenie kosztów związanych z dostarczaniem substratów do reakcji (Ogunleye i wsp. 2015).



Schemat 4. Szlaki syntezy kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA). Na podstawie Hsueh i wsp. (2017), zmodyfikowane.

Początkowo γ -PGA analizowano głównie w kontekście medycyny i biotechnologii przemysłowej, jednak w ostatnich latach badania koncentrują się na jego potencjale aplikacyjnym w rolnictwie, szczególnie w łagodzeniu skutków suszy glebowej i poprawie zrównoważonej produktywności agroekosystemów. Najlepiej udokumentowanym kierunkiem zastosowania γ -PGA jest ulepszanie właściwości fizycznych gleby. Biopolimer zwiększa pojemność wodną gleb, zwłaszcza lekkich i piaszczystych, stabilizuje agregaty glebowe oraz ogranicza tempo infiltracji i parowania wody. Wydłuża to okresy jej dostępności dla korzeni i minimalizuje spadki turgoru w roślinach w warunkach okresowych niedoborów opadów. W badaniach polowych prowadzonych na glebach piaszczystych aplikacja γ -PGA poprawiała wzrost *Brassica rapa* oraz efektywność wykorzystania wody (WUE, ang. *water use efficiency*) (Liu i wsp. 2022), a w przypadku *Gossypium* γ -PGA stosowany w systemach nawadniania kropłowego poprawiał plon i jakość włókna przy jednoczesnym wzroście współczynnika WUE (Liang i wsp. 2019).

Kolejnym istotnym aspektem jest bezpośrednie oddziaływanie γ -PGA na fizjologię roślin. W uprawach polowych *Z. mays* egzogeny biopolimer zwiększał zawartość chlorofilu, intensywność fotosyntezy oraz masę części nadziemnej, szczególnie w warunkach suszy (Ma i wsp. 2022). Poprawa tych parametrów u *B. napus* i *B. rapa* była związana zarówno z lepszym statusem wodnym roślin, jak i modulacją mechanizmów obronnych, gdyż wykazano wzrost aktywności enzymów

antyoksydacyjnych (SOD, CAT, POD), obniżenie poziomu MDA oraz akumulację proliny, co wskazuje na ograniczenie uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych przez RFT (Xu i wsp. 2020; Liu i wsp. 2022). Podobne efekty obserwowano u *Z. mays* oraz *G. hirsutum* (Ma i wsp. 2022; Wang i wsp. 2025a, 2025b). Istotną rolę w odpowiedzi na γ -PGA odgrywa również regulacja hormonalna. W warunkach suszy biopolimer powodował akumulację ABA u *Z. mays*, prowadząc do zamykania aparatów szparkowych oraz ograniczenia transpiracji i utrzymania homeostazy wodnej (Xu i wsp. 2020). Efekt ten powiązано z regulacją ekspresji genów związanych z biosyntezą tego stresowego fitohormonu (Ma i wsp. 2022). Jednocześnie obserwowano poprawę efektywności fotosyntezy i lepsze wypełnienie ziarna (Zhai i wsp. 2024).

Biopolimer γ -PGA pełni również funkcję nośnika składników nawozowych. Dzięki zdolności chelatowania jonów metali i tworzenia kompleksów z makro- i mikroelementami ogranicza ich wymywanie z gleby oraz zwiększa dostępność dla roślin. Jako komponent nawozów o kontrolowanym uwalnianiu poprawia efektywność nawożenia, zmniejsza straty azotu i wspiera założenia zrównoważonego rolnictwa, redukując eutrofizację (Shi i wsp. 2023). Jego stosowanie podnosi plonowanie roślin uprawnych o ok. 10-30%, przy jednoczesnej redukcji zużycia nawozów mineralnych w podobnym zakresie (Al-Wahili i wsp. 2023).

Coraz więcej wyników badań wskazuje, że działanie γ -PGA obejmuje modyfikację mikrobiomu ryzosfery. Biopolimer stymuluje rozwój korzystnych mikroorganizmów, w tym PGPR, modulując różnorodność mikrośrodowiska korzeniowego. Zmiany w strukturze i aktywności mikrobiologicznej synergistycznie wzmacniają tolerancję roślin na niedobór wody poprzez poprawę pobierania składników pokarmowych, w tym azotu, fosforu i potasu, produkcję fitohormonów, np. auksyn oraz ograniczenie presji ze strony patogenów (Ma i wsp. 2022).

1.5. Luka badawcza i uzasadnienie podjęcia badań

Pomimo udokumentowanego wpływu γ -PGA na poprawę właściwości fizycznych gleby i zwiększenie tolerancji roślin na suszę, dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na modelowych gatunkach z rodzin wiechlinowatych, np. *Z. mays* i kapustowatych np. *B. napus* (Xu i wsp. 2013; Xu i wsp. 2020). Prowadzone analizy dotyczyły głównie ogólnych parametrów fizjologicznych roślin związanych z częścią nadziemną. System korzeniowy, odgrywający kluczową rolę w adaptacji do warunków

niedoboru wody, pozostaje słabo zbadany w kontekście γ -PGA. Nadal brakuje kompleksowej charakterystyki molekularnych mechanizmów działania tego polimeru w tkankach korzeni, w tym procesów związanych z sygnalizacją hormonalną, regulacją ekspresji genów odpowiedzi na stres, aktywnością białek obronnych oraz zmianami metabolicznymi. Kwestie te nie były badane u *L. luteus* uprawianego w warunkach niedoboru wody w glebie, a krytyczną lukę badawczą stanowi brak danych demonstrujących wpływ γ -PGA na kształtowanie brodawek korzeniowych, molekularne mechanizmy regulujące odpowiedź korzeni oraz interakcje pomiędzy polimerem a procesami odpornościowymi. Zatem podjęcie badań w tym zakresie jest w pełni uzasadnione zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i aplikacyjnego.

Biorąc pod uwagę udokumentowany potencjał γ -PGA do łagodzenia negatywnych skutków stresu suszy glebowej u innych gatunków roślin, sformułowano dla *L. luteus* następujące hipotezy badawcze:

- 1) Skuteczność biostymulacji *L. luteus* za pomocą egzogennej γ -PGA jest determinowana zarówno przez dawkę polimeru, jak i precyzyjnie dobrany termin aplikacji, co optymalizuje interakcje symbiotyczne w warunkach deficytu wody w glebie.
- 2) γ -PGA działa jako regulator homeostazy strukturalnej zmniejszający podatność na suszę poprzez zachowanie integralności brodawek korzeniowych, wzmocnienie potencjału antyoksydacyjnego oraz selektywną modyfikację składu ścian komórkowych, a przez to ich struktury i właściwości.
- 3) Podniesienie tolerancji *L. luteus* na stres suszy pod wpływem γ -PGA wynika z jego zdolności do stabilizowania balansu hormonalnego i lipidowego oraz modyfikowania profilu białkowego systemu korzeniowego.

Uzyskane wyniki mogą mieć fundamentalne znaczenie zarówno dla badań podstawowych nad fizjologią roślin w układzie gleba-roślina-mikrobiom, jak i dla praktyki rolniczej, w tym rozwoju biostymulatorów wspomagających uprawę roślin strączkowych w warunkach postępujących zmian klimatycznych.

2. CEL PRACY

Od 2011 r. w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu prowadzone są badania nad wpływem suszy glebowej na przemiany zachodzące w systemie korzeniowym *L. luteus*. Obejmują one trzy główne nurty badawcze: pierwszy związany z fitohormonami, drugi z modyfikacją ścian komórkowych oraz trzeci, poświęcony stresowi oksydacyjnemu. Niniejsza praca stanowi logiczną kontynuację tych analiz, rozszerzając zakres badawczy o wpływ egzogenego γ -PGA na mechanizmy odpowiedzi na stres. Jej celem było określenie, czy ten biopolimer może łagodzić negatywne skutki suszy glebowej w korzeniach *L. luteus*.

Deficyt wody w glebie prowadzi do nieprawidłowości we wzroście i funkcjonowaniu systemu korzeniowego *L. luteus* (Frankowski i wsp. 2015; Wilmowicz i wsp. 2020, 2022; Burchardt i wsp. 2024), a najbardziej dotkliwe zmiany zachodzą w brodawkach korzeniowych. Stresor ten zmniejsza liczbę wytworzonych brodawek korzeniowych, które w obrazie mikroskopowym wykazują cechy charakterystyczne dla utraty turgoru komórek, a zmiany genetyczne i biochemiczne wskazują także na zaburzenia w funkcjonowaniu tych struktur (Wilmowicz i wsp. 2020; Burchardt i wsp. 2024).

Jednym ze sposobów łagodzenia następstw suszy glebowej u roślin jest stosowanie biostymulatorów. W niniejszej pracy zastosowano syntetyczny, nietoksyczny, nieimmunogeny, biodegradowalny γ -PGA. Oddziaływanie tej substancji na korzeń *L. luteus* uprawianego w warunkach ograniczonej dostępności wody, określono na podstawie wyników doświadczeń fizjologicznych, obserwacji mikroskopowych oraz badań molekularnych, biochemicznych i proteomicznych.

Szczegółowe cele pracy:

- **Określenie efektywności działania syntetycznego γ -PGA, w zależności od dawki i czasu aplikacji, na podstawie:**
 - Pokroju roślin (długość pędu i korzenia, liczba wytworzonych brodawek korzeniowych);
 - Maksymalnej wydajności fotochemicznej fotoukładu II (Fv/Fm);
 - Badania względnej zawartości wody w korzeniu z brodawkami korzeniowymi;
 - Poziomu osmoprotektanta – proliny.

- **Zbadanie wpływu γ -PGA na strukturę komórek oraz przemiany zachodzące na poziomach genetycznym i biochemicznym w oparciu o wyniki analiz:**
 - Histologicznych i ultrastrukturalnych brodawek korzeniowych;
 - Aktywności transkrypcyjnej genów (*LILOX*, *LIACS*, *LIACO*, *LIZEP*, *LILOX*, *LILBOP*, *LILbI*), których ekspresja zmienia się w odpowiedzi na deficyt wody w glebie;
 - Funkcjonowania systemu uruchamianego w odpowiedzi na stres oksydacyjny – produkcja H_2O_2 i ASC oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych – SOD, CAT, APX, GWPX;
 - Zawartości MDA jako markera peroksydacji lipidów błonowych;
 - Składu i stopnia estryfikacji metylowej pektyn;
 - Poziomu wybranych pektyn (galaktany, arabinany, XGA);
 - Akumulacji ksyloglukanów.
- **Zbadanie wpływu γ -PGA na homeostazę hormonalną poprzez immunolokalizację:**
 - ABA;
 - Prekursora ET - ACC;
 - JA.
- **Zbadanie wpływu γ -PGA na metabolizm kwasów tłuszczowych poprzez analizę:**
 - Poziomu LOX;
 - Lokalizacji FAAH.
- **Sprawdzenie odpowiedzi rośliny na γ -PGA na poziomie proteomu poprzez wykonanie:**
 - Analiz identyfikacji białek.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał roślinny, warunki uprawy i warianty badawcze

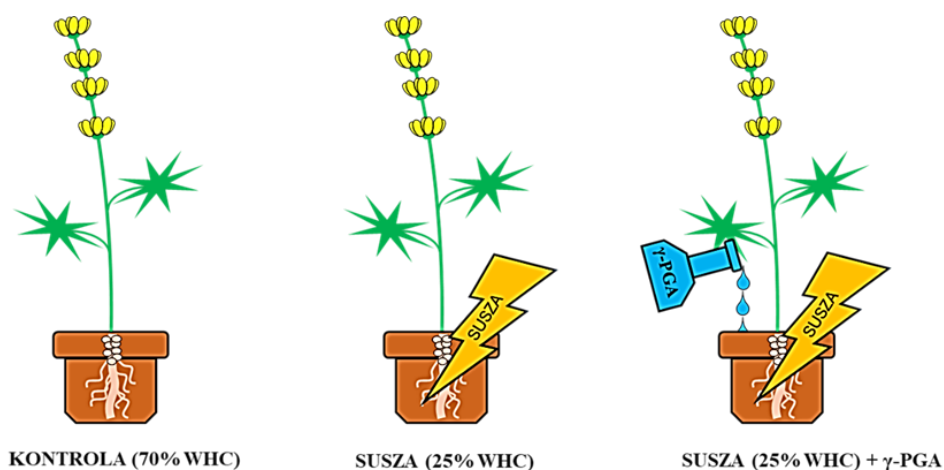
Podczas realizacji złożeń niniejszej dysertacji wykorzystano epigonalną odmianę Taper łubinu żółtego (*L. luteus* L., Fot. 1), który należy do rodziny bobowatych (*Fabaceae*). W odniesieniu do form tradycyjnych odmiana ta wyróżnia się wysoką równomiernością dojrzewania, krótszym okresem wegetacji, wyższym współczynnikiem plonowania oraz niskimi wymaganiami glebowymi. Dodatkowym atutem jest jej wyższa odporność na antraknozę (Jasińska i Kotecki 1999; Wiatr i Dolata 2008; Kalinowski 2014).

Materiał siewny pozyskano z Poznańskiej Hodowli Roślin Tulce k/Wiatrowa (Polska), z którą Katedra Fizjologii Roślin współpracowała w ramach realizacji Programu Wieloletniego MRiRW. Nasiona przed wysiewem zaprawiano preparatem przeciwgrzybowym Sarfun T 65 DS (Ciech, Grupa QEMETICA Soda Polska S.A., Janikowo) w dawce 250 ml/100 kg nasion przez 24 h, a następnie inokulowano je przez 2 h szczepionką bakteryjną Nitragina (Biofood S.C., Wałcz, w ilości 3 g/1 kg nasion). W kolejnym etapie nasiona wysiewano do materiału glebowego klasy V (Zamek Bierzgłowski, woj. kujawsko-pomorskie, 53°06'24.0"N 18°27'02.5"E), którym wypełniano donice o pojemności 11 dm³ (po 5 nasion na donicę w odległości ~0,05 m, na głębokość ~0,04 m). Przedstawione warunki uprawy zostały wcześniej zoptymalizowane i opisane przez Frankowskiego i wsp. (2014) oraz z powodzeniem stosowane w dotychczasowych pracach eksperymentalnych prowadzonych na *L. luteus* (Kućko i wsp. 2019a; Wilmowicz i wsp. 2020; Florkiewicz i wsp. 2020; Wilmowicz i wsp. 2022; Burchardt i wsp. 2024).



Fotografia 1. Kwitnące rośliny łubinu żółtego (*L. luteus*) odmiany epigonalnej Taper. Zdjęcie wykonano w 48 dniu uprawy roślin.

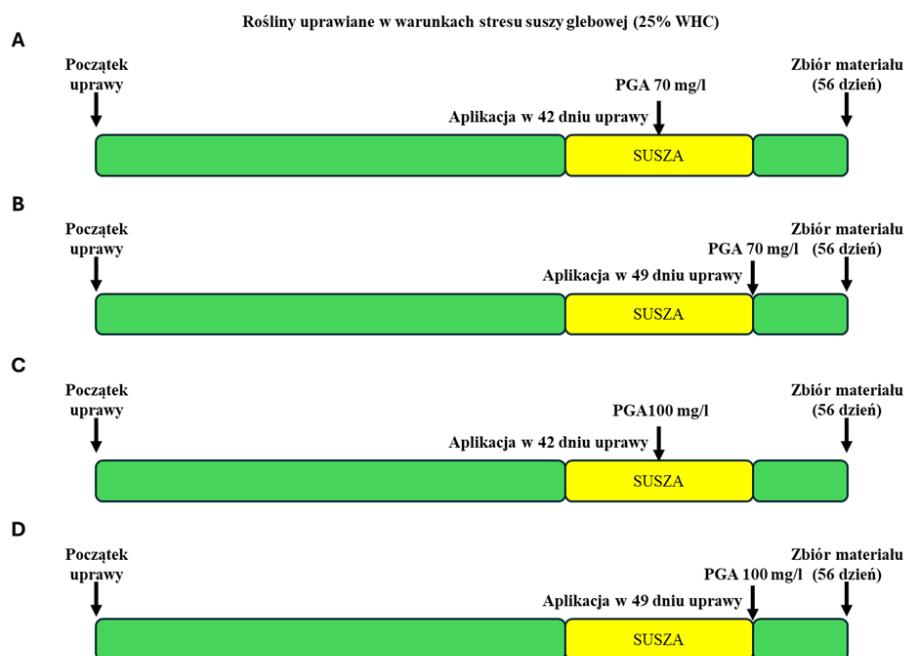
Uprawę roślin prowadzono w komorach fitotronowych Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu, w kontrolowanych warunkach świetlnych (8 h ciemności + 16 h światła, świetlówki Smartlux PRO i FLUORA o łącznym strumieniu mocy $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Osram, Osram Licht AG, Monachium) oraz temperaturowych ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Rośliny podlewano wodą w ilościach dostosowanych do aktualnej fazy rozwojowej, zapewniając pełną pojemność wodną gleby (WHC, ang. *Water Holding Capacity*) na poziomie 70%, identyczną we wszystkich doniczkach. Oznaczono ją metodą wagową zgodną z polską normą PN-ISO 11465. W 35 dniu od wysiewu nasion rośliny podzielono na grupy. Pierwszą z nich uprawiano w dalszym ciągu w warunkach optymalnej pełnej pojemności wodnej (70% WHC), drugą grupę poddano działaniu 14-dniowej suszy glebowej (25% WHC), a trzecią grupę roślin uprawiano w warunkach deficytu wody w glebie (25% WHC) i traktowano wodnym roztworem syntetycznej soli sodowej γ -PGA (Schemat 5).



Schemat 5. Warianty doświadczenia stosowane podczas badania przydatności kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) w łagodzeniu skutków suszy glebowej w korzeniach *Lupinus luteus*. Kontrola – rośliny uprawiane w warunkach optymalnej pełnej pojemności wodnej gleby (70% WHC); susza – rośliny poddane stresowi wodnemu, w warunkach ograniczonej pełnej pojemności wodnej gleby (25% WHC); susza + γ -PGA – rośliny narażone na stres suszy (25% WHC) i traktowane kwasem poli- γ -glutaminowym (γ -PGA).

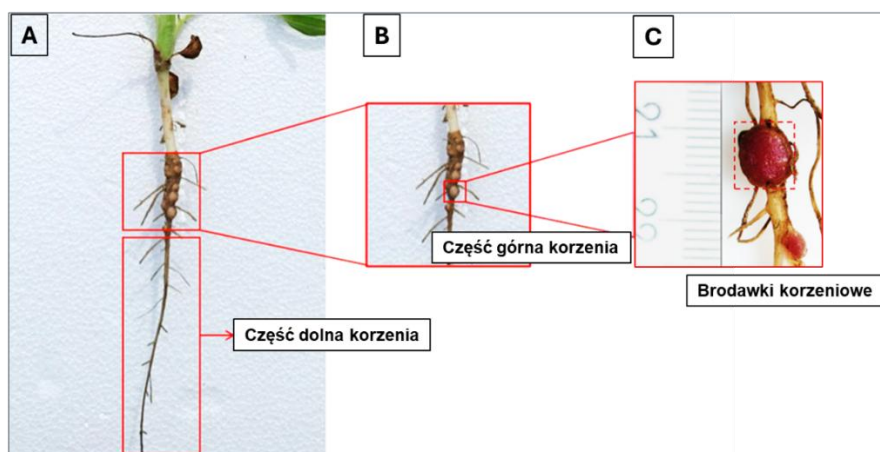
W celu optymalizacji stężenia γ -PGA efektywnie wpływającego na wzrost roślin, na podstawie dostępnych danych literaturowych (Xu i wsp. 2020; Zhu i wsp. 2024), wytypowano dwa stężenia roztworów (70 i 100 mg/l) stosowane w eksperymentach. Syntetyczny γ -PGA rozpuszczono bezpośrednio przed użyciem w wodzie destylowanej,

a uzyskany roztwór aplikowano pipetą po 15 ml na roślinę. Zoptymalizowano także czas aplikacji tego związku. Na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych przez Wilmowicz i Kućko (KFRiB UMK w Toruniu) wytypowano dwa kluczowe momenty szczególnej wrażliwości *L. luteus* na stres suszy, tj. 42 i 49 dzień uprawy (Schemat 6). Odpowiadają one kolejno końcowi fazy wegetatywnej oraz początkowi kwitnienia. Faza generatywna u *L. luteus* rozpoczyna się około 49 dnia i trwa do około 55 dnia uprawy. W 49 dniu obserwuje się wzmożoną aktywność symbiotyczną brodawek korzeniowych związaną z inicjacją kwiatostanów, natomiast około 55 dnia dochodzi do zawiązywania strąków (Frankowski i wsp. 2015; Wilmowicz i wsp. 2019). Przejście do fazy generatywnej wiąże się z dużym zapotrzebowaniem na energię i asymilaty, które muszą być efektywnie dostarczane z liści do rozwijających się organów generatywnych. Dlatego czas aplikacji γ -PGA ustalono na 42 i 49 dzień uprawy, co pozwala ocenić jego skuteczność w warunkach odpowiednio początkowej oraz późniejszej fazy stresu. Okres przejściowy pomiędzy rozwojem wegetatywnym a generatywnym jest dobrym momentem dla aplikacji roztworu γ -PGA, który, wykazując działanie wspomagające roślinę w warunkach suszy, może zabezpieczyć prawidłowe funkcjonowanie korzenia oraz transport asymilatów do wytwarzanych organów generatywnych.



Schemat 6. Warianty aplikacji γ -PGA roślinom uprawianym w warunkach suszy glebowej. Rośliny podlewano w 42 lub 49 dniu uprawy wodnym roztworem soli sodowej kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) w stężeniu 70 mg/l lub 100 mg/l. Materiał do badań zbierano w 56 dniu uprawy roślin.

Materiał do badań zbierano w 56 dniu uprawy roślin. Do oznaczenia RWC oraz zawartości proliny wykorzystano górną część korzenia zawierającą brodawki (Fot. 2A, B). Do analiz biochemicznych (poziom MDA i H_2O_2 , aktywność CAT, APX, GWPX, pomiar stężenia ASC, zawartość pektyn, testy dot blot, Western blot i 2-DE) zebrano górną część korzenia, którą przy użyciu skalpela pozbawiono brodawek korzeniowych, następnie mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. $-80^{\circ}C$. Wycięte brodawki użyto do analiz histologicznych (błękit toluidyny, czerwien rutenowa), ultrastrukturalnych, RT-qPCR oraz immunolokalizacji (Fot. 2C). Brodawki przeznaczone do obserwacji mikroskopowych niezwłocznie po zebraniu utrwalono i zatopiono w odpowiedniej żywicy (szczegóły dotyczące żywicy: *podrozdz. 3.1.3 Roztwory podstawowe oraz bufor*), natomiast te, przeznaczone do izolacji RNA zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. $-80^{\circ}C$.



Fotografia 2. System korzeniowy *Lupinus luteus* L. uprawianego w optymalnych warunkach pełnej pojemności wodnej gleby (70% WHC, kontrola). Materiał do badań stanowiły korzenie. Część górną korzenia wraz z brodawkami korzeniowymi oraz część dolną niewytwarzającą brodawek (A), część górną korzenia w powiększeniu (B), brodawka korzeniowa w przekroju (C).

3.1.2. Odczynniki i dostępne komercyjnie gotowe zestawy

Podczas prowadzenia badań wykorzystano odczynniki o stopniu czystości co najmniej cz. d. a., enzymy i komercyjne zestawy, które wyszczególniono w Tabeli 1. Dla enzymów użyto zoptymalizowanych buforów zalecanych przez producenta. W przypadku komercyjnych zestawów postępowano zgodnie z instrukcjami dołączonymi przez producenta.

Tabela 1. Zestawy i odczynniki wykorzystywane w trakcie badań

Producent	Odczynniki i/lub zestaw
AGRISERA	przeciwciała pierwotne: anty-JA (AS11 1799), anty-LOX (AS06 128), anty-ACC (AS11 1800), anty-ABA (AS09 446), anty-FAAH (AS16 3972); przeciwciała wtórne znakowane fluorochromem Alexa Fluor 488: anty-królicze (AS09 633) i anty-szczurze (AS09 638); przeciwciała wtórne znakowane HRP: anty-szczurze (AS10 1187), anty-królicze (AS09 602); zestaw do chemidetekcji AgriseraECL SuperBright (AS16 ECL-S-100)
ALCHEM	aceton, błękit bromofenolowy, chloroform CHROMASOLV $\geq 99.8\%$ do HPLC, etylowy alkohol bezwodny 99,8%, glicerol bezwodny $\geq 99.5\%$, kwas octowy lodowaty 99,5%, kwas ortofosforowy 85%, metanol CHROMASOLV $\geq 99.9\%$ do HPLC, toluen, kwas kakodylowy
POL-AURA	2,2'-bipirydył, szczawian amonu, chlorek żelaza (III) 98%, Coomassie Brilliant Blue R-250
GENOMED	oligonukleotydy do reakcji qPCR
INVITROGEN	Ambion™ Nuclease-Free Water
Kerafast	monoklonalne przeciwciała pierwotne: anty-JIM5 (ELD004), anty-JIM7 (ELD005), anty-LM5 (ELD007), anty-LM6 (ELD008), anty-LM8 (ELD012), anty-LM15 (ELD013), anty-LM24 (ELD014), anty-LM25 (ELD015)
Ted Pella	Citifluor
Macherey-Nagel	NucleoSpin RNA Plant – zestaw do izolacji całkowitego RNA
Sigma-Aldrich	akrylamid, 2-mercaptoethanol, Amersham™ Protran® Premium Western blotting nitrocellulose membrane, butylowany hydroksytoluen, albumina surowicy bydłowej, czerwień rutenowa, DAPI, DTT, EDAC, EDTA, eter benzylowo- etylowy, glicyna, aldehyd glutarowy, wodorofosforan (V) dipotasu, diwodorofosforan (V) potasu, kwas 2-tiobarbiturowy, kwas L-askorbinowy, kwas sulfosalicylowy, kwas trichlorooctowy, L-prolina, metakrylan butylu, metakrylan metylu, TEMED, wodorofosforan (V) disodu, APS, diwodorofosforan (V) sodu, ninhydryna, czterotlenek osmu, paraformaldehyd, PMSF, RNaseZAP, SDS, γ -PGA, błękit toluidyny, trizma, tiokarbonydrazyd, żelazocyjanek potasu, kwas borowy, diwodorofosforan (V) sodu, wodorofosforan (V) disodu
POCH	wodorotlenek potasu, wodorotlenek sodu, chlorek sodu, chlorek potasu, tlenek propylenu, chlorek wapnia
Polysciences	kapsułki BEEM, Ultra Low Viscosity Embedding Kit
Roche	zestaw do odwrotnej transkrypcji - Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, zestaw do reakcji qPCR - LightCycler TaqMan Master Kit
Bio-Rad	ReadyPrep™ 2-D Starter Kit, ReadyStrip™ IPG Strips 7 cm (pH 3-10), EveryBlot Blocking Buffer, 40% akrylamid/bis 29:1
EurX	agaroza, barwnik DNA/RNA SimplySafe™, markery wielkości RNA/DNA (Simply Gene DireX 100bp, 1Kb DNA Ladder RTU)
ThermoFisher Scientific	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

3.1.3. Roztwory podstawowe oraz bufor

W Tabeli 2 zawarto skład buforów oraz roztworów stosowanych w niniejszej pracy. Do przygotowania każdego z nich wykorzystano wodę dejonizowaną, wolną od RNaz (Milli-Q). W zależności od potrzeb, sporządzone roztwory filtrowano lub autoklawowano.

Tabela 2. Skład chemiczny buforów i roztworów wykorzystanych podczas prowadzenia eksperymentów

Roztwór/ bufor	Skład
Bufor 1 x TBE, pH 8,3	90 mM Tris 90 mM kwas borowy 20 mM EDTA
Bufor obciążający do elektroforezy w żelu agarozowym	0,25% błękit bromofenolowy 0,25% cyjanoksylen 1% fikor 400 60% glicerol
Bufor do elektroforezy białek	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM glicyna 3,5 M SDS
Bufor do izolacji białek przeznaczonych do analiz Western blot i dot blot	50 mM Tris-HCl 2 mM EDTA 5 mM PMSF
0,1 M bufor fosforanowy, pH 7,2, 100 ml (do analiz aktywności enzymów antyoksydacyjnych)	7,5% wodorofosforan (V) disodu 9,9% diwodorofosforan (V) disodu H ₂ O
Bufor Laemmli'ego (bufor obciążający do prób białkowych)	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% SDS 20% glicerol 5% błękit bromofenolowy
Bufor TBS, pH 7,4	20 ml 1 M Tris 25 ml 4 M chlorek sodu uzupełnić H ₂ O do 1 l
Bufor 1x PBS, pH 7,2 (500 ml, 10 mM)	4 g chlorek sodu 0,1 g chlorek potasu 0,72 g wodorofosforan (V) disodu 0,12 g diwodorofosforan (V) potasu H ₂ O
Bufor fosforanowo-potasowy, pH 7,8 (500 ml, 50 mM)	1,49 g diwodorofosforan (V) sodu 3,81 g wodorofosforan (V) disodu 0,01 M EDTA 0,01 M E-64 0,01 M DTT H ₂ O
Kwaśny roztwór ninhydryny	0,625 g ninhydryny 15 ml 99,5 % kwasu octowego 10 ml 85 % kwasu ortofosforowego

80% etanol z 0,01% butylohydroksytoluenem (BHT)	80 ml etanolu 20 ml H ₂ O 0,01 g BHT
Odczynnik „+TBA”	0,5 g TBA 20 g TCA 0,01 g BHT uzupełnić H ₂ O do 100 ml
Odczynnik „-TBA”	20 g TCA 0,01 g BHT uzupełnić H ₂ O do 100 ml
20% roztwór TCA w acetonie (do wytrącania białek i oznaczeń biochemicznych)	20 g TCA uzupełnić acetonem do 100 ml
0,5% roztwór wzorcowy BSA do oznaczenia stężenia białek	0,5 g BSA 100 ml H ₂ O
Roztwór szczawianu amonu	0,5% szczawian amonu H ₂ O
Roztwór chlorku wapnia do płukania tkanki	0,5 mM chlorek wapnia H ₂ O
Żywica BMM	20 ml metakrylanu butylu 5 ml metakrylanu metylu 125 mg eteru benzylo-etylowego 0,0385 g DTT
Wodny 1% roztwór blokujący BSA	10 mg albuminy surowicy bydlęcej 100 ml H ₂ O
1% roztwór blokujący BSA do dot blot	10 mg albuminy surowicy bydlęcej 100 ml buforu TBS, pH 7,4
Roztwór barwiący do żeli	0,6% Coomassie Brilliant Blue R-250 50% metanol 10% kwas octowy H ₂ O
Roztwór odbarwiający do żeli	5% metanol 7% kwas octowy H ₂ O
Roztwór L-proliny w 3% kwasie sulfosalicylowym	0,5% L-prolina 3% kwasu sulfosalicylowego
Odczynnik Bradforda (200 ml)	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml 95% etanolu 100 ml 85% kwasu ortofosforowego uzupełnić H ₂ O do 200 ml

3.1.4. Żele do przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego RNA i białek

Podczas przygotowania żeli użyto wody wolnej od RNaz. Składy chemiczne żeli agarozowych (do rozdzielania RNA) oraz poliakrylamidowych (do rozdzielania białek) zaprezentowano w Tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Skład chemiczny 1% żelu agarozowego do elektroforezy kwasów nukleinowych

	Odczynnik	Ilość/objętość
1% żel agarozowy (120 ml)	agaroz	1,2 g
	bufor 1 x TBE	120 ml
	EURX [®] SimplySafe [™]	1,2 µl

Tabela 4. Skład chemiczny żeli poliakrylamidowych do rozdzielania białek

	Odczynnik	Objętość
4% żel zagęszczający	40% roztwór akrylamid-bisakrylamid (29:1)	600 µl
	1,25 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
	10% SDS	25 µl
	H ₂ O	3,1 ml
	10% APS	25 µl
	TEMED	5 µl
12% żel rozdzielający	40% roztwór akrylamid-bisakrylamid (29:1)	3 ml
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS	100 µl
	H ₂ O	4,4 ml
	10% APS	50 µl
	TEMED	10 µl

3.2. Metody

3.2.1. Ocena pokroju roślin, pomiar parametrów biometrycznych i fizjologicznych

W celu zweryfikowania wpływu γ -PGA na *L. luteus* uprawiany w warunkach suszy glebowej, w pierwszym etapie badań określono wybrane cechy biometryczne: długość pędu i korzenia oraz liczbę brodawek korzeniowych wytworzonych przez roślinę. Rośliny wyjęto z doniczek, nie naruszając systemu korzeniowego. Nadmiar gleby z korzeni usunięto delikatnie pędzelkiem, tak aby nie doprowadzić do uszkodzenia organów. Długość pędu zmierzono od szczyłki korzeniowej do wierzchołka wzrostu pędu, natomiast długość systemu korzeniowego zmierzono od szczyłki korzeniowej do wierzchołka korzenia głównego. W celu ustalenia liczby brodawek korzeniowych wytworzonych przez roślinę preparowano je skalpelem i liczono.

3.2.2. Ocena maksymalnej wydajności fotosystemu II

W celu zbadania wpływu γ -PGA oraz suszy glebowej na maksymalną wydajność fotochemiczną fotosystemu II określono wartość współczynnika Fv/Fm w liściach. Pomiar wykonano fluorymetrem (OS-30P, Opti-Sciences Inc., USA), według metody

Weng (2006), na 3 najstarszych liściach każdej rośliny z danego wariantu doświadczalnego, w trzech powtórzeniach biologicznych oraz trzech powtórzeniach technicznych. Liście roślin zacieniano na 30 min klipsem analitycznym. Następnie w otworze klipsa umieszczono fotodiode elektroluminescencyjną LED (długość fali 650 nm, z filtrem bliskiej podczerwieni – NIR), otwierano przesłonę klipsa i wykonywano pomiar. Natężenie promieniowania wysycającego chlorofil wynosiło 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, a czas trwania impulsu świetlnego wynosił 1 s.

3.2.3. Badanie względnej zawartości wody w korzeniach

Celem zbadania wpływu γ -PGA i suszy glebowej na zdolność *L. luteus* do utrzymania wody w komórkach określono stopień uwodnienia tkanek, wyrażany względną zawartością wody (RWC, ang. *Relative Water Content*). Analizy przeprowadzono dla górnej części korzeni *L. luteus* zawierających brodawki korzeniowe. Do badań pobrano organy z pięciu roślin z każdego wariantu doświadczalnego, które bezpośrednio po zbiorze zważono w celu wyznaczenia ich świeżej masy. Następnie próbki umieszczono w szalkach Petriego wypełnionych wodą destylowaną i pozostawiono w temp. pokojowej, w ciemności na 4 h do osiągnięcia przez tkanki stanu pełnego turgoru. Po tym czasie nadmiar wody z korzeni usunięto przy pomocy bibuły i zważono, wyznaczając masę tkanki wysuszonej wodą. W kolejnym kroku materiał wysuszono w termostacie (temp. 100°C) przez 24 h., następnie próbki zważono, uzyskując suchą masę. Wartość RWC obliczono według wzoru:

$$\text{RWC} = \frac{\text{świeża masa} - \text{sucha masa}}{\text{masa przy pełnym turgorze} - \text{sucha masa}} * 100\%$$

3.2.4. Oznaczenie poziomu markerów stresu

W celu sprawdzenia, czy γ -PGA i susza glebowa wpływają na stopień peroksydacji lipidów, oznaczono poziom MDA. Wykorzystano metodę Hodgesa i wsp. (1999) z pewnymi modyfikacjami opisanymi przez Kućko i wsp. (2022). Wykonano test z TBA, który tworzy z MDA związki chemiczne wyższego rzędu, a ich stężenie można oznaczyć spektrofotometrycznie. Górną część korzenia (~0,5 g), z uprzednio usuniętymi brodawkami korzeniowymi, zhomogenizowano w schłodzonym mózdzierzu w obecności ciekłego azotu. Dodano 2 ml 80% EtOH zawierającego 0,01% BHT. Otrzymany homogenat zwirowano ($3000 \times g$, 10 min, temp. 4°C) w probówkach typu Eppendorf. Uzyskany supernatant wykorzystano do dalszych analiz. Równolegle przygotowano dwa

zestawy probówek typu Eppendorf: pierwszy na próby z odczynnikiem TBA i drugi na próby z odczynnikiem bez TBA. Do każdej probówki z pierwszego zestawu dodano 350 µl uzyskanego supernatantu, 350 µl wody destylowanej i 700 µl odczynnika z TBA (skład: Tabela 2). Do każdej probówki z drugiego zestawu dodano 350 µl supernatantu, 350 µl wody destylowanej i 700 µl odczynnika bez TBA (skład: Tabela 2). Próby zerowe zawierały 350 µl 80% EtOH z 0,01% BHT. Mieszaniny inkubowano przez 20 min w łaźni wodnej (temp. 95°C), chłodzono je na lodzie, aby zahamować reakcję, ponownie zwirowano (3000 × g, 10 min, temp. 4°C) w celu usunięcia ewentualnych strąków białkowych lub innych nierozpuszczalnych składników. W ostatnim etapie zmierzono absorbancję uzyskanych supernatantów przy długościach fali: 600 nm, 532 nm i 440 nm względem prób zerowych zawierających: 0,5 ml 80% EtOH, 0,5 ml H₂O i 1 ml odczynnika z TBA (dla prób z serii „+ TBA”) oraz 0,5 ml 80% EtOH, 0,5 ml H₂O i 1 ml odczynnika bez TBA (dla prób z serii „- TBA”). Stężenie MDA w poszczególnych próbach obliczono według wzorów:

$$\begin{aligned} & (Abs_{532\text{ nm}} + TBA - Abs_{600\text{ nm}} + TBA) - (Abs_{532\text{ nm}} - TBA - Abs_{600\text{ nm}} - TBA) = A \\ & (Abs_{440\text{ nm}} + TBA - Abs_{600\text{ nm}} + TBA) * 0,0571 = B \\ & MDA_{equiv} [nmol * ml^{-1}] = \frac{A - B}{157000} * 10^6 \end{aligned}$$

Zbadanie wpływu γ-PGA i suszy glebowej na utrzymanie równowagi osmotycznej wymagało określenia poziomu proliny akumulowanej w roślinach w warunkach stresu osmotycznego. Do oznaczenia tego wskaźnika w korzeniach *L. luteus* wykorzystano zmodyfikowaną metodę opisaną przez Ábrahám i wsp. (2010). Górną część korzeni (~0,5 g) zawierających brodawki korzeniowe zhomogenizowano w mrożdziej w obecności ciekłego azotu. Następnie dodano 3% kwasu sulfosalicylowego (2,5 ml) i zworteksowano. Homogenat przeniesiono do schłodzonych probówek typu Eppendorf i zwirowano (18000 x g, 5 min, temp. 21°C). Przygotowano nowe probówki typu Eppendorf, a w nich mieszaniny reakcyjne zawierające 100 µl badanego supernatantu, 100 µl 3% kwasu sulfosalicylowego, 200 µl lodowatego kwasu octowego i 200 µl kwaśnego roztworu ninhydryny. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w bloku grzejmym w temp. 96°C przez 30 min, a następnie schłodzono na lodzie (3 min). W kolejnym kroku próby ekstrahowano z 1 ml toluenu, zworteksowano i pozostawiano na 5 min w temp. pokojowej w celu rozdzielenia fazy wodnej i organicznej. Fazę organiczną zawierającą chromofor umieszczono w kuwetach kwarcowych, zmierzono absorbancję przy długości fali 520 nm. Ilość proliny oznaczono w odniesieniu do krzywej standardowej.

Do oznaczenia zawartości H_2O_2 w tkance wykorzystano metodę opisaną przez Junglee i wsp. (2014) opartą na utlenianiu przez H_2O_2 jonów jodkowych (I^-) do wolnego jodu (I_2) oraz jego redukcję do H_2O . Tkanę zhomogenizowano w schłodzonym mózdzierzu w obecności ciekłego azotu. Odważono 0,15 g rozdrobnionej tkanki i umieszczono ją w sterylnych probówkach typu Eppendorf, do których dodano 1,5 ml 1% roztworu TCA. Otrzymane ekstrakty zwirowano (15 min, 13000 x g, temp. 4°C). Uzyskany supernatant przeniesiono do nowych, sterylnych probówek. W kolejnym etapie przygotowano mieszaniny reakcyjne składające się z 0,25 ml ekstraktu, 0,25 ml 10 mM buforu fosforanowo-potasowego o pH 7,0 oraz 0,5 ml 1 M roztworu jodku potasu. Mieszaniny dokładnie zworteksowano, a następnie inkubowano w ciemności przez 15 min w temp. 21°C. Próbę ślepą stanowiła mieszanina, do której zamiast ekstraktu roślinnego dodano 0,25 ml 1% TCA. Po inkubacji mieszaniny reakcyjne przeniesiono do płytki 96-dółkowej, wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 350 nm (czytnik mikroplatek SpectraMax iD3s). Zawartość H_2O_2 określono na podstawie krzywej standardowej przygotowanej z seryjnych rozcieńczeń H_2O_2 w 1% TCA.

Stężenie zredukowanej formy askorbinianu (ASC) oznaczano wykorzystując metodę opisaną przez Kato i Esaka (1999). Test ten opiera się na redukcji jonów żelaza (Fe^{3+} do Fe^{2+}) przez ASC i spektrofotometrycznej detekcji Fe^{2+} tworzącego kompleks z 2,2'-bipirydylem. Górną część korzeni ($\pm 0,3$ g), z których usunięto brodawki korzeniowe, homogenizowano w ciekłym azocie i ekstrahowano przez 15 min 6% TCA w temp. 0°C. Uzyskany homogenat odwirowano z prędkością 15000 x g przez 5 min w temp. 4°C. W kolejnym kroku przygotowano mieszaniny reakcyjne, których skład wymieniono w Tabeli 5. Próbę ślepą stanowiła mieszanina zawierająca 6% roztwór TCA zamiast ekstraktu.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji oznaczania stężenia kwasu askorbinowego

Składnik	Objętość [μl]	
	Próba badana	Próba ślepa
Ekstrakt	200	0
6% TCA	0	200
0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,4	600	600
H_2O dejonizowana	200	200
10% TCA	1000	1000
42% H_3PO_4	800	800
2,2'-bipirydył	800	800
3% FeCl_3	400	400

Po dodaniu FeCl_3 mieszaninę natychmiast zworteksowano, a następnie inkubowano w temp. pokojowej przez 60 min. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 525 \text{ nm}$. Stężenie ASC określano na podstawie odniesienia do krzywej wzorcowej i wyrażano w $\mu\text{g/ml g FW}$.

3.2.5. Izolacja i oznaczanie poziomu pektyn

Do oznaczania zawartości pektyn wykorzystano metodę spektrofotometryczną opisaną przez Liu i wsp. 2019. Korzenie ($\pm 0,1 \text{ g}$) opłukano $0,5 \text{ mM}$ roztworem chlorku wapnia, a następnie wodą dejonizowaną. W kolejnym etapie fragmenty tkanki homogenizowano w moździerzu w obecności schłodzonego 75% etanolu ($0,5 \text{ ml}$), a uzyskaną zawiesinę wirowano $10000 \times g$, 10 min . W celu oczyszczenia osadu, przemywano go mieszaniną metanolu z chloroformem ($1:1, \text{ v/v}$), a następnie acetonem, po czym próbki liofilizowano. Właściwa ekstrakcja pektyn polegała na dwukrotnej inkubacji wyizolowanych ścian komórkowych w $0,5\%$ roztworze szczawianu amonu (97°C , 1 h). Po dwóch seriach inkubacji próbki wirowano ($10000 \times g$, 10 min). Zebrane supernatanty połączono, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 280 nm .

3.2.6. Analizy molekularne

Do wykonania analiz użyto szkła i porcelany wyprażanych przez 12 h w temp. 250°C , sterylnych probówek i jednorazowych końcówek do pipet z filtrami. Do dekontaminacji aparatury elektroforetycznej z RNaz zastosowano preparat RNaseZAP.

3.2.6.1. Izolacja całkowitego RNA

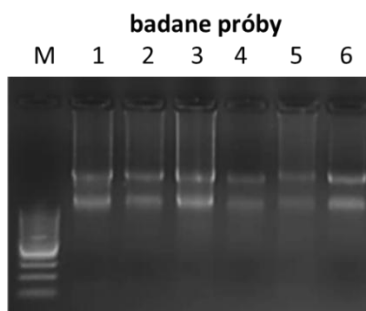
Całkowitą pulę RNA wyizolowano z brodawek korzeniowych *L. luteus* przy użyciu zestawu NucleoSpin RNA Plant. Procedurę przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zamieszczonymi w instrukcji producenta.

W sterylnym, uprzednio schłodzonym moździerzu, umieszczono tkankę roślinną ($\sim 100 \text{ mg}$), którą rozdrobniono na jednorodny proszek przy użyciu pistla, w obecności ciekłego azotu. Roztartą tkankę przeniesiono do sterylnych probówek typu Eppendorf, a następnie poddano lizie buforem denaturującym. Ekstrakty nanoszono na kolumnienki filtracyjne, następnie kolumnienki wiążące. W celu usunięcia ewentualnych pozostałości genomowego DNA preparaty trawiono za pomocą rDNazy dołączonej do zestawu. Enzym po reakcji wypłukano z kolumnienki, związane RNA oczyszczono. Jego całkowitą pulę eluowano $40 \mu\text{l}$ wody wolnej od RNaz. Preparaty przechowywano w temp. -80°C do dalszych analiz.

3.2.6.2. Analiza ilościowa i jakościowa RNA

Uzyskane całkowite RNA poddano analizie ilościowej. Stężenie preparatów oznaczono spektrofotometrycznie (spektrofotometr Nanodrop, Thermo Fisher) w objętości 1 μ l. Pomiary wykonano względem wody wolnej od RNaz. Wynik końcowy wyrażano jako średnią arytmetyczną z trzech pomiarów. Czystość RNA potwierdzono w oparciu o wartość współczynnika A_{260}/A_{280} , który dla wszystkich prób wynosił ok. 2,0, co świadczy o braku zanieczyszczeń białkowych lub fenolowych. W celu zbadania, czy wyizolowany kwas nukleinowy nie uległ degradacji, przeprowadzono analizę jakościową metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym z barwnikiem EURX® SimplySafe™ (w stosunku 1 μ l/100 ml żelu) w buforze 1xTBE, zastosowano napięcie 5 V/cm.

Do studzienki nałożono 0,5 μ g RNA. Obecność wyraźnych prążków 18S/28S rRNA (Fot. 3) wykluczyła degradację RNA. Niezdegradowane RNA o wysokiej czystości i jakości wykorzystano jako matrycę w reakcji odwrotnej transkrypcji.



Fotografia 3. Obraz rozdziału elektroforetycznego przykładowych prób całkowitego RNA wyizolowanego z brodawek korzeniowych *L. luteus*. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 1% żelu agarozowym. Do każdej studzienki naniesiono 0,5 μ g RNA badanej próby. M – marker wielkości cząsteczkowej (Simply Gene DireX 1Kb RTU DNA Ladder). Próbkki: 1 – Kontrola, 2 – Susza, 3 – Susza + γ -PGA 70 mg/l aplikowany w 7 dniu trwania stresora, 4 – Susza + γ -PGA 100 mg/l aplikowany w 7 dniu trwania stresora, 5 – Susza + γ -PGA 70 mg/l aplikowany w 14 dniu trwania stresora, 6 – Susza + γ -PGA 100 mg/l aplikowany w 14 dniu trwania stresora.

3.2.6.3. Reakcje qRT-PCR

3.2.6.3.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji

W celu zbadania aktywności transkrypcyjnej genów, których ekspresja może zmieniać się w odpowiedzi na suszę glebową oraz pod wpływem γ -PGA, wykorzystano standardowe metody PCR stosowane w biologii molekularnej. RNA uzyskane we wcześniejszym etapie z brodawek korzeniowych wykorzystano do syntezy cDNA w reakcji z enzymem Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase oraz zakotwiczonymi starterami oligo(dT)₁₈ hybrydującymi z poliadenylowanymi 3'

końcami mRNA. Do reakcji użyto 1 µg RNA, a poszczególne składniki mieszaniny reakcyjnej oraz etapy reakcji zaprezentowano w Tabeli 6.

Tabela 6. Reakcje odwrotnej transkrypcji – skład mieszaniny reakcyjnej i warunki

Składnik	Ilość [µl]	Stężenie końcowe
RNA	zmienna	1 µg
Oligo(dT) ₁₈ (50 pmol/µl)	1	2,5 µM
Denaturacja: 65°C, 10 min		
5 x Bufor (Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer)	4	1 x
Inhibitor RNaz (Protector RNase Inhibitor) (40 U/µl)	0,5	20 U
dNTP mix 10 mM	2	1 mM
DTT	1	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1	10 U
Odwrotna transkrypcja: 55°C, 30 min		
Zatrzymanie reakcji: 85°C, 5 min		

3.2.6.3.2. Badanie ekspresji genów w czasie rzeczywistym

Do określenia aktywności transkrypcyjnej genów w brodawkach korzeniowych *L. luteus* zastosowano technikę qPCR. Opiera się ona na użyciu starterów (Tabela 7) komplementarnych do określonego fragmentu cDNA oraz sond hydrolizujących (UPL) z detekcją fluorescencyjną, co warunkuje czułość i specyficzność reakcji. Amplifikowano geny związane z biosyntezą ET (*LIACS*, *LIACO*), jasmonianów (*LILOX*), ABA (*LIZEP*) oraz te, których białkowe produkty są odpowiedzialne za funkcjonowanie brodawek korzeniowych (*LIBOP*, *LILbl*).

Tabela 7. Startery specyficzne i sondy użyte podczas reakcji qPCR

Analizowany gen (numer akcesyjny NCBI)	Sekwencja startera (5' → 3')	Numer sondy
<i>LIACS</i> (KF573522)	FWP: TTCATTCAAGAAGGCAATGGT RWP: GGTTTGGGTCAAAAGTCACC	53
<i>LIACO</i> (KF573523)	FWP: GTGATGAAGGAATTTGCACAAG RWP: CCAAGGTTTTTCACACAGCAA	53
<i>LIBOP</i> (KC792647.1)	FWP: GGAACCTCGTCAAGCTCATGG RWP: GGCGTAGTGTAAGGCCAATG	133
<i>LILOX</i> (KAE9620454)	FWP: TTTTCAACACTGGGCTTGACT RWP: CTCGGCATGATGGCTTCTA	133
<i>LIZEP</i> (KF887951)	FWP: GGGTTTCCGGTTCTTGGTAT RWP: AAAGCCATTCGACTAATAACTCTTG	165
<i>LILbl</i> (Y00401.1)	FWP: GGGTTCTGTCCATGTCTCAAA RWP: TCAGGATTGCTTCCTTCACC	105
<i>LIACT</i> (KP257588)	FWP: TAATGGTTGGGATGGGTCAG RWP: TTCAAGGTGAGAATACCCCTCT	165

Ekspresję badanych genów przeliczano w odniesieniu do genu referencyjnego (*LACT*), który niezależnie od warunków zewnętrznych charakteryzuje się stałą ekspresją we wszystkich organach. Ilościową analizę względnej ekspresji genów przeprowadzono z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta C_t$, polegającej na porównaniu wartości progowych cykli amplifikacji (C_t , ang. *threshold cycle*) dla badanych genów i genu referencyjnego.

Dla każdego analizowanego genu wykonano krzywą wzorcową opartą na czteropunktowym szeregu rozcieńczeń cDNA (10-, 100-, 1000- i 10000-krotnych) uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji. Seria rozcieńczeń służyła jednocześnie do oceny efektywności amplifikacji (90–100%) oraz liniowości reakcji ($R^2 > 0,99$). Dla każdego analizowanego genu przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia techniczne. Efektywność amplifikacji, wyznaczona na podstawie nachylenia krzywych standardowych, wynosiła średnio $\pm 1,8$. Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem systemu LightCycler 2.0 (Roche) oraz gotowego zestawu master mix LightCycler TaqMan Master. Mieszaniny reakcyjne (pełny skład w Tabeli 8) zawierały matrycę cDNA lub wodę (kontrola negatywna, która pozwalała na wykluczenie niespecyficznej amplifikacji i kontaminacji). Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 9. Analizę uzyskanych danych przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania LightCycler Software 4.1 (Roche).

Tabela 8. Składy mieszanin reakcyjnych w reakcjach qPCR

Skład	Objętość w próbie [μ l]
cDNA	1
Starter F (10 μ M)	0,2
Starter R (10 μ M)	0,2
Sonda UPL	0,1
LightCycler TaqMan Master Mix	2
H ₂ O	6,5

Tabela 9. Warunki reakcji qPCR

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Liczba powtórzeń
Denaturacja wstępna	95	600	–
Denaturacja właściwa	95	10	45
Przyłączanie starterów	59	30	
Amplifikacja cDNA	72	1	
Chłodzenie	40	30	–

3.2.6.4. Analizy białek

3.2.6.4.1. Izolacja

Wykonanie analiz metodami Western blot, dot blot oraz 2-DE wymagało izolacji białek o dobrej jakości i wysokim stężeniu. W tym celu zamrożony wcześniej materiał roślinny (± 1 g) roztarto w moździerz w obecności ciekłego azotu. Do moździerza z utartą tkanką dodano bufor ekstrakcyjny (skład: Tabela 2) w stosunku 1:1 (w/v), po czym całość zebrano do probówki. Następnie próby wytrząsano przez 20 min w temp. 4°C i wirowano przez 30 min w temp. 4°C przy 13500 x g. Uzyskany supernatant przeniesiono do świeżych probówek typu Eppendorf i podzielono. Część przeznaczoną do analiz dot blot przechowywano w temp. -20°C. Do pozostałej części nadsącza dodano roztwór 20% TCA w acetonie w celu wytrącenia wszystkich białek. Mieszaniny inkubowano w temp. -20°C przez 12 h. Kolejnego dnia próby zwirowano (13500 x g, 30 min, temp. 4°C) i odrzucono supernatant. Uzyskany osad wypłukano trzykrotnie 1 ml mieszaniny EtOH i octanu etylu w stosunku 1:1 (v/v), a następnie wirowano przez 1 min (5000 x g, temp. 4°C). W zależności od przeznaczenia osad rozpuszczono w buforze ekstrakcyjnym (skład: Tabela 2). Próby przeznaczone do analiz Western blot przechowywano w temp. -20°C, natomiast te, wykorzystywane do analiz 2-DE, zamrożono w temp. -80°C. Stężenie białek zmierzono spektrofotometrycznie (spektrofotometr SHIMADZU UV mini-1240) zgodnie z metodą Bradforda (Bradford 1976).

Proces izolacji białek do oznaczeń aktywności enzymatycznej prowadzono w ten sam sposób jak powyżej. Fragmenty tkanek rozcierano, następnie do moździerza dodawano bufor fosforanowy (skład w Tabeli 2) w stosunku 1:1 (1 ml buforu: 1 mg tkanki). Próby wytrząsano przez 1 h w temp. 4°C, a następnie wirowano przez 30 min (13500 x g, temp. 4°C). Uzyskany w ten sposób supernatant przechowywano do dalszych analiz w temp. -20°C.

3.2.6.4.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Badanie jakości wyizolowanych białek niezbędnych do wykonania analiz Western blot oraz 2-DE wymagało rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Pobrano 20 μ g białka, dodano bufor denaturujący Laemmli'ego (1:1, v:v) i inkubowano w temp. 95°C przez 5 min. Warunki te gwarantowały całkowitą denaturację i redukcję mostków disiarczkowych. Zdenaturowane próby naniesiono na żel (skład: Tabela 4) o wymiarach 7 $\times$ 8 cm, przygotowany według protokołu Laemmli'ego (1970). Elektroforezę przeprowadzono w aparacie Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) w

buforze elektroforetycznym (skład: Tabela X) przez ± 120 min przy stałym napięciu 90 V. Warunki te pozwoliły uzyskać optymalny rozdział białek w zakresie mas cząsteczkowych od 40 do około 250 kDa.

3.2.6.4.3. Western-blot

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka przeniesiono na membranę nitrocelulozową (Amersham™ Protran®) przy użyciu systemu Mini-PROTEAN® Tetra Cell i buforu do transferu (skład: Tabela 2). Niespecyficzne miejsca wiązania na membranach zablokowano roztworem blokującym (skład: Tabela 2) przez 2 h. Po tym czasie nadmiar roztworu blokującego wypłukano dwukrotnie przez 5 min buforem TBS, pH 7,4 (skład: Tabela 2). Inkubację z poliklonalnymi przeciwciałami pierwotnymi (anty-LOX 1:1000 v/v w TBS, pH 7,4 z dodatkiem 1% roztworu blokującego) prowadzono przez noc w temp. 4°C. Następnego dnia membrany wypłukano trzykrotnie po 10 min w buforze TBS pH 7,4. Inkubację z wtórnymi poliklonalnymi przeciwciałami antykróliczymi, znakowanymi HRP (1:10000 w TBS pH, 7,4), prowadzono przez 2 h w temp. pokojowej. Po tym czasie membrany wypłukano trzykrotnie po 10 min w buforze TBS pH, 7,4. Detekcję sygnału fluorescencyjnego przeprowadzono przy użyciu zestawu ECL SuperBright, a wyniki zwizualizowano za pomocą skanera ChemiDoc Touch® BioRad. W końcowym etapie wykonano analizę densytometryczną przy wykorzystaniu oprogramowania ImageJ.

3.2.6.4.4. Dot blot

Na membranę nitrocelulozową (Amersham™ Protran®) naniesiono 5 µg białka w małych porcjach po ok. 1 µl. Następnie zablokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał na membranach roztworem blokującym (skład: Tabela 2) przez 2 h. Po tym czasie membrany wypłukano dwukrotnie buforem TBS, pH 7,4 (skład: Tabela 2). W kolejnym etapie przeprowadzono inkubację z monoklonalnymi szczurzymi przeciwciałami pierwotnymi (anty-JIM5, anty-JIM7, anty-LM5, anty-LM6, anty-LM8, anty-LM15, anty-LM24, anty-LM25; 1:1000 v/v w 1% roztworze blokującym w TBS, pH 7,4) przez noc na wytrząsarce w temp. 4°C. Następnego dnia membrany wypłukano 3 x 10 min w buforze TBS, pH 7,4 i inkubowano przez 2 h w roztworze antyszczurzych przeciwciał drugorzędowych, znakowanych HRP (1:10000, v/v) przygotowanych w 1% roztworze blokującym w TBS, pH 7,4. Po tym czasie membrany płukano 3 x 10 min w buforze TBS, pH 7,4. Detekcję sygnału fluorescencyjnego, wizualizację wyników i analizę densytometryczną prowadzono analogicznie jak w reakcjach Western blot.

3.2.6.4.5. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Do monitorowania różnic w składzie mieszaniny białek wyizolowanych z korzeni *L. luteus* traktowanych γ -PGA i uprawianych w warunkach suszy w odniesieniu do tych poddanych jedynie działaniu stresu, niezbędne było wykonanie ogniskowania izoelektrycznego. Ten etap wymagał zastosowania zestawu ReadyPrep 2-D Starter Kit, pasków ReadyStrip IPG Strips o długości 7 cm i zakresie pH 3–10 oraz aparatu PROTEAN i12 IEF. W probówce wymieszano 120 μ g białka, które uzupełniono buforem do rehydratacji (składnik zestawu) do końcowej objętości 125 μ l. Próby zworteksowano i odwirowano przez 1 min przy obrotach $1000 \times g$. Gotową mieszaninę przeniesiono do waniek rehydracyjnych, pipetując próby wzdłuż krawędzi kanału tak, aby zachować równomierność rozłożenia na jego całej długości. Następnie, przy użyciu sterylnej pęsety, zdjęto folię ochronną z paska IPG i umieszczono go żelem do dołu w waniencie rehydracyjnej. Na koniec delikatnie docisnięto pasek od góry, aby usunąć ewentualnie powstałe pęcherzyki powietrza, i pokryto je równomiernie ± 3 ml oleju mineralnego, aby zapobiec parowaniu prób. Tackę rehydracyjną zamknięto pokrywką i pozostawiono na 12 h w temp. pokojowej, aby zapewnić przeniknięcie białek do żelu. Kolejnego dnia w czystej tacce do ogniskowania PROTEAN i12 IEF umieszczono za pomocą sterylnej pęsety papierowe knoty na obu końcach kanałów oraz zwilżano je wodą. Następnie paski IPG chwyciono za pomocą pęsety i ustawiono w pozycji pionowej przez 7–8 s, aby umożliwić usunięcie nadmiaru oleju mineralnego. Po tym czasie paski IPG umieszczono w tacce do ogniskowania tak, aby strona z żelem skierowana była do dołu, zwracając uwagę na zachowanie właściwej orientacji (koniec oznaczony jako „+” znajdował się przy elektrodzie dodatniej, a koniec „-” przy elektrodzie ujemnej). Jest to niezbędne dla prawidłowej migracji białek podczas ogniskowania. Paski IPG pokryto ± 3 ml świeżego oleju mineralnego, aby zapobiec parowaniu prób, po czym sprawdzono, czy pod nimi nie znajdują się pęcherzyki powietrza. Tacę z paskami umieszczono w komorze PROTEAN i12 IEF i przeprowadzono rozdział według programu (Tabela 10) dopasowanego do pasków IPG o długości 7 cm.

Tabela 10. Parametry zastosowane podczas ogniskowania izoelektrycznego

IPG 7 cm	Napięcie	Czas	Woltogodziny	Przebieg
Etap 1	250 V	20 min.	n.d.	Liniowy
Etap 2	4000 V	2 h	n.d.	Liniowy
Etap 3	4000 V	n.d.	10 000 Vhr	Szybki

Po zakończeniu rozdziału paski IPG wyjęto, usunięto nadmiar oleju mineralnego i przechowywano je w temp. -80°C (stroną pokrytą żelam ku górze) do późniejszego wykorzystania w drugim etapie elektroforezy.

Rozdział elektroforetyczny w drugim kierunku przeprowadzono przy użyciu zestawu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Procedurę prowadzono zgodnie z instrukcjami producenta dołączonymi do zestawu ReadyPrep 2-D Starter Kit. Przygotowywano 12% żel poliakrylamidowy (skład: Tabela 4), pozostawiając około 1 cm wolnej przestrzeni, którą później uzupełniano agarozą. Paski IPG przeniesiono z temp. -80°C do temp. 20°C i pozostawiono stroną pokrytą żelam ku górze celem ich rozmrożenia. W tym czasie przygotowano bufor Equilibration Buffer I i II (w zestawie) zgodnie z zaleceniami producenta. Do waniek z paskami IPG dodano 2,5 ml Equilibration Buffer I, a następnie mieszano na wytrząsarce (60 rpm) przez 10 min. Następnie przechylono tackę w celu usunięcia buforu i dodano po 2,5 ml Equilibration Buffer II do każdego paska IPG. Tackę z paskami ponownie umieszczono na wytrząsarce i mieszano delikatnie przez kolejne 10 min. W czasie inkubacji pasków rozpuszczono agarozę (w zestawie). Po 10 min Equilibration Buffer II usunięto jak wyżej. Z 12% żelu SDS-PAGE usunięto nadmiar wody za pomocą bibuły. Na wąski pasek bibuły naniesiono 5 μl markera (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder), a następnie umieszczono pomiędzy szklanymi płytkami u podstawy żelu poliakrylamidowego. Cylinder o pojemności 100 ml uzupełniano buforem do elektroforezy białek (Tabela 2), uważając, aby na powierzchni nie pojawiły się pęcherzyki powietrza. Następnie paski IPG zanurzono w cylindrze, po czym ostrożnie umieszczono je na powierzchni żelu poliakrylamidowego, pomiędzy szklanymi płytkami i w pobliżu markera białkowego. Za pomocą igły docisnięto delikatnie pasek do studzienki w celu usunięcia ewentualnych pęcherzyków powietrza, jednocześnie unikając kontaktu igły z żelam. Na dno żelu poliakrylamidowego naniesiono za pomocą pipety Pasteura rozpuszczoną agarozę. Gotowy żel ustawiono pionowo i pozostawiono na około 15 min w celu polimeryzacji. Po polimeryzacji agarozy żel umieszczono w aparacie do elektroforezy, który wypełniano 1x buforem SDS-PAGE (skład: Tabela 2). Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 120 V do momentu wypłynięcia zawartego w żelu barwnika do roztworu, przy czym w celu optymalnego wprowadzenia białek do żelu na początku zastosowano napięcie 90 V. Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego ostrożnie oddzielano pasek IPG od żelu. Żel przeniesiono do roztworu barwiącego (skład: Tabela 2) i barwiono przez 12 h. Po tym czasie żel wypłukano wodą destylowaną, a następnie przeniesiono do szalki Petriego

zawierającej roztwór odbarwiający (skład: Tabela 2). Usuwano zużyty roztwór i dodawano jego świeżą porcję, aż do momentu wypłukania nadmiaru barwnika. Widoczne na odbarwionym żelu plamy białkowe dokumentowano za pomocą czytnika (Azure 400, Azure Biosystems, 6747 Sierra Court, Suite A-B, Dublin, California, USA). Tę część pracy doktorskiej wykonano w ramach współpracy z Panią dr Patrycją Wojtacką z Katedry Biochemii UMK w Toruniu.

Po wykonaniu rozdziału 2-DE określono różnice w profilach białkowych uzyskanych z korzeni kontrolnych, korzeni roślin rosnących w warunkach stresu suszy oraz korzeni roślin poddanych działaniu suszy i traktowanych γ -PGA. Wycięto fragmenty żeli przeznaczone do identyfikacji białek metodą MALDI-TOF, którą wykonano na zlecenie w Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

3.2.6.4.6. Oznaczenie aktywności katalazy i peroksydazy w żelu

Analizę wykonano według protokołu opisanego przez Pokorę i wsp. (2003) oraz Tukaj i Pokora (2006), który został zoptymalizowany dla tkanek *L. luteus* i opisany przez Kućko i wsp. (2020a). Zamrożone w -80°C fragmenty korzeni bez brodawek korzeniowych roztarto w moździerzu do uzyskania jednolitego proszku, a następnie zawieszono w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowo-potasowego, pH 7,8 z inhibitorami proteaz (0,01 M EDTA, 0,01 M E-64, 0,01 M DTT). Zawiesinę homogenizowano przez 3 min z użyciem szklanych kulek w stożkowych probówkach. Homogenat przeniesiono do probówki typu Eppendorf, a kulki trzykrotnie przemyto 0,5 ml buforu z inhibitorami, uzyskując końcową objętość 2 ml. Po usunięciu pozostałości przez odwirowanie (30 min, $15000 \times g$, 4°C), uzyskany supernatant wykorzystano do testów enzymatycznych i analizy PAGE.

Aktywność APX w ekstraktach oceniono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną opisaną przez Nakano i Asada (1981) oraz Aksmann i wsp. (2016), opartą na pomiarze wzrostu absorbancji przy długości fali 430 nm w wyniku utleniania pirogallolu. Wyniki przedstawiono jako mmol pirogallolu utlenionego $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka. Aktywność CAT, oznaczaną metodą Aksmann i wsp. (2016) wyrażano w μmol wykorzystanego $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ białka. Analizy wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Tę część pracy doktorskiej wykonano we współpracy z Panem dr hab. Wojciechem Pokorą, prof. UG z Katedry Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego.

3.2.6.4.7. Spektrofotometryczne oznaczenie aktywności peroksydazy gwajakolowej

W celu określenia aktywności GWPX zastosowano zmodyfikowaną spektrofotometryczną metodę opisaną przez George'a (1952). Jej aktywność określono przy użyciu gwajakolu, który ulega utlenieniu do tetragwajakolu w obecności H_2O_2 . Do oznaczenia aktywności enzymu przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z 50 μl 1% H_2O_2 , 50 μl 1% gwajakolu, 900 μl 50 mM buforu fosforanowego, pH 7,4 oraz 50 μl ekstraktu białkowego. Składniki dodano w przedstawionej kolejności, zmieszano, a następnie po upływie 1 min dokonano pomiaru absorbancji w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali $\lambda = 470 \text{ nm}$. Aktywność enzymu wyrażono jako ilość tetragwajakolu utworzonego w jednostce czasu ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

3.2.7. Przygotowanie materiału do analiz mikroskopowych

Materiał przeznaczony do analiz mikroskopowych wymagał utrwalenia. Uniwersalny utrwalacz chemiczny przygotowano poprzez rozpuszczenie 2 g paraformaldehydu w 20 ml H_2O . Następnie mieszaninę podgrzano do temp. 60°C w łaźni wodnej, a powstały osad rozpuszczono, mieszając z kilkoma kroplami 1 M NaOH. Do schłodzonego, klarownego roztworu dodano 0,5 ml aldehydu glutarowego, 25 ml $1 \times \text{PBS}$, pH 7,2 i 0,5 g EDAC. W ostatnim kroku mieszaninę przesączono, ustalono pH do 7,2 i uzupełniono wodą do objętości 50 ml. Dodatek 1% EDAC w roztworze utrwalacza umożliwia kowalencyjne sprzężenie fitohormonów z białkami strukturalnymi poprzez ich usieciowanie. Mechanizm ten pozwala na precyzyjną lokalizację przestrzenną tych związków w komórkach (Ondizghi-Assoume i wsp. 2016).

Fragmenty korzeni zawierające brodawki korzeniowe, przeznaczone do analiz histologicznych oraz immunocytochemicznych z wykorzystaniem przeciwciał, ostrożnie preparowano przy użyciu skalpela i umieszczano w temp. 4°C na 12 h w probówkach zawierających roztwór utrwalacza uniwersalnego. Po tym czasie z probówek usunięto utrwalacz, a fragmenty tkanki wypłukano trzykrotnie (po 10 min) buforem $1 \times \text{PBS}$, pH 7,2. Utrwalony materiał odwodniono w roztworach EtOH o wzrastających stężeniach, z dodatkiem DTT w proporcji 15 mg/ml EtOH. Proces odwadniania przeprowadzono w następujących etapach: 30% EtOH + DTT – 1 h, temp. pokojowa; 50% EtOH + DTT – 1 h, temp. pokojowa; 70% EtOH + DTT – 12 h, temp. 4°C ; 90% EtOH + DTT – 1 h, temp. pokojowa; 99,8% EtOH + DTT – 2 h, temp. pokojowa. W kolejnym etapie materiał przesycano żywicą BMM, przygotowaną poprzez wymieszanie wszystkich jej składników (skład: Tabela 2) i przesycenie uzyskanego roztworu przez 15 min w

strumieniu azotu. Przechowywano ją w temp. 4°C. Materiał roślinny przesycono stopniowo żywicą i EtOH z dodatkiem DTT: BMM: 99,8% EtOH + DTT w stosunku 1:3 (v/v) przez 24 h w temp. 4°C, następnie BMM: 99,8% EtOH + DTT w stosunku 1:1 (v/v) przez 24 h w temp. 4°C, BMM: 99,8% EtOH + DTT w stosunku 3:1 (v/v) przez 24 h w temp. 4°C i 100% BMM przez 7 dni w temp. 4°C. Po tym czasie przesycone fragmenty tkanek umieszczono w kapsułkach Beem, które wypełniano 100% roztworem żywicy BMM. Jej polimeryzację prowadzono w świetle UV przez 4 doby w temp. -20°C.

3.2.8. Krojenie materiału na półcienkie skrawki i analiza histologiczna

Zatopiony w żywicy materiał wyjęto z kapsułek BEEM® i krojono na półcienkie skrawki (1,5 µm) przy użyciu ultramikrotomu Leica UTC z nożem diamentowym, a następnie umieszczono je na silanizowanych szkiełkach mikroskopowych. Gotowe preparaty barwiono błękitem metylenowym (0,05%) do analizy struktury tkankowej lub 0,02% roztworem czerwieni rutenowej celem detekcji pektyn kwaśnych (Sabba i Lulai 2002). Obrazowanie wykonano w mikroskopie Zeiss Axioplan z kamerą ProGres C3.

3.2.9. Immunofluorescencyjna lokalizacja związków

Żywicę BMM usunięto z fragmentów tkanek umieszczonych na szkiełkach podstawowych, przepłukując je kolejno dwiema porcjami 100% acetonu (po 20 min), wody destylowanej (po 3 min) oraz buforem 1× PBS, pH 7,2 (5 min). Następnie na preparaty naniesiono po 50 µl 1% roztworu BSA i inkubowano je w wilgotnej komorze w temp. 4°C przez 2 h w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Po tym czasie skrawki inkubowano z przeciwciałami pierwotnymi (Tabela 11) w roztworze BSA przez 12 h w wilgotnej komorze w temp. 4°C. Następnie przeciwciała pierwotne usunięto, płuczac preparaty trzykrotnie buforem 1× PBS, pH 7,2 (po 10 min). W kolejnym etapie skrawki inkubowano w wilgotnej komorze w temp. 37°C z odpowiednimi przeciwciałami wtórnymi, znakowanymi fluorochromem Alexa Fluor 488 w stężeniach przedstawionych w Tabeli 11. Po zakończeniu reakcji przeciwciała wtórne odpłukiwano trzykrotnie buforem 1× PBS, pH 7,2 (po 5 min). W celu wybarwienia DNA na skrawki nakładano 25 µl DAPI w stężeniu 1 µg/ml i poddawano 10-minutowej inkubacji. Po tym czasie jego nadmiar usunięto, płuczac preparaty trzykrotnie wodą po 5 min. Na preparaty nałożono antyfadant (Citifluor), aby wydłużyć trwałość sygnału fluorescencyjnego. Obserwacje oraz dokumentację prowadzono za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI4000B (filtry BP365, FT395 i LP397).

Tabela 11. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do przeprowadzenia reakcji immunocytochemicznych na półcienkich skrawkach

Przeciwciało (rozpoznawany epitop/ pochodzenie)	Zastosowane rozcieńczenie w 1% BSA w 1 x PBS, pH 7,2
Przeciwciała pierwotne	
anty-ABA/ poliklonalne królicze	1,5:25
anty-ACC/ poliklonalne królicze	1:25
anty-JA/ poliklonalne królicze	1,5:25
anty-FAAH/ poliklonalne królicze	1:25
Przeciwciała wtórne znakowane fluorochromem Alexa Fluor 488	
anty-królicze	1:250

3.2.10. Analiza ultrastruktury

W celu poprawy kontrastu ultrastruktury w mikroskopii TEM zastosowano barwienie pośrednie (*en bloc*) asparaginianem ołowiu, zgodnie z techniką opisaną przez Waltona (1979) i zmodyfikowaną przez Kopriwę (1984). Fragmenty brodawek umieszczono w probówkach o pojemności 1,5 ml wypełnionych 1 ml roztworu utrwalającego, zawierającego 3% (v/v) aldehyd glutarowy w 0,15 M buforze kakodylanu sodu o pH 7,4. Utrwalanie prowadzono przez 12 h w temp. 4°C. Materiał wypłukano 0,15 M buforem kakodylanu sodu o pH 7,4, a następnie inkubowano z 2% (v/v) roztworem czterotlenku osmu z 3% żelazocyjankiem potasu (w/v) w 0,15 M buforze kakodylanu sodu o pH 7,4 (1 h na lodzie). W kolejnym etapie materiał umieszczano w 1% (w/v) tiokarbohydrazynie (w temp. 20°C przez 20 min) i ostatecznie w 2% (v/v) roztworze czterotlenku osmu (w temp. 20°C przez 30 min). Próbkę wybarwiono przez noc 1% (w/v) octanem uranylu, a następnie poddawano obróbce termicznej przez 30 min w temp. 60°C w roztworze asparaginianu ołowiu pH 5,5. Po inkubacji materiał trzykrotnie przepłukano wodą Milli-Q i odwadniano go w temp. 4°C w roztworach EtOH o wzrastającym stężeniu (30%, 50%, 70%, 85% i 95%, po 10 min każdy). Odwadnianie zakończono trzema płukaniem w 100% etanolu, każde po 10 min w temp. 4°C. Wówczas materiał zatapiano w żywicy Spurr (Polysciences Europe GmbH). W tym celu tkankę przepłukano 3-krotnie (po 20 min) tlenkiem propylenu. Następnie przesycono ją roztworem tlenku propylenu:Spurr w stosunku 2:1 przez 30 min; kolejno roztworem tlenku propylenu:Spurr w stosunku 1:2 przez 30 min; a na koniec 100% żywicą Spurr w zamkniętych fiolkach przez noc na wytrząsarce orbitalnej. Kolejnego dnia przygotowano foremki do zatapiania, które dokładnie wysuszono. Fragmenty korzeni z brodawkami przeniesiono za pomocą pęsety do formy, którą wypełniono świeżą żywicą Spurr. Przygotowane w ten sposób kapsułki umieszczono w inkubatorze o temp. 65°C i polimeryzowano przez 2 dni. Po

zakończeniu tego procesu materiał cięto na ultracienkie skrawki (70 nm) przy użyciu ultramikrotomu Leica UTC wyposażonego w nóż diamentowy. Uzyskane skrawki osadzono na niklowych siatkach mikroskopowych. Gotowe preparaty analizowano w mikroskopie TEM Jeol EM 1010 przy napięciu 80 kV. Tę część pracy wykonano w ramach współpracy z Panią dr hab. Katarzyną Niedojadło, prof. UMK z Katedry Biologii Komórkowej i Molekularnej UMK w Toruniu.

4. WYNIKI

4.1. Optymalizacja dawki oraz czasu aplikacji γ -PGA

W pierwszym etapie zoptymalizowano stężenie oraz czas aplikacji γ -PGA, a efektywność jego działania określono na podstawie wybranych parametrów biometrycznych, uwzględniając nadziemną oraz podziemną część rośliny. *L. luteus* uprawiany w warunkach 2-tygodniowej suszy glebowej (25% WHC) traktowano roztworem γ -PGA o stężeniu 70 mg/l lub 100 mg/l. Zastosowano dwa warianty jego aplikacji: pierwszy w połowie trwania suszy (7 dzień suszy, przypadający na 42 dzień uprawy roślin) i drugi pod koniec działania stresora, bezpośrednio przed zawiązaniem kwiatostanów (14 dzień suszy, przypadający na 49 dzień uprawy roślin).

Najpierw określono wpływ γ -PGA, podawanego *L. luteus* uprawianemu w warunkach deficytu wody w glebie, na długość pędu (Fig. 1A). Susza zmniejszyła ten parametr o około 60% w odniesieniu do roślin kontrolnych. Egzogenny γ -PGA częściowo zniósł efekt wywołany przez stresor, przy czym niezależnie od zastosowanego stężenia silniejsze działanie wywołał, gdy aplikowano go w 14 dniu trwania stresu. Skutkiem tego był prawie 70% wzrost długości pędu w odniesieniu do roślin uprawianych w warunkach suszy, przy czym wartość ta była nadal o ponad 35% niższa niż u roślin kontrolnych. Dodatkowo w obu badanych wariantach czasowych roztwór γ -PGA o stężeniu 70 mg/l był skuteczniejszy niż roztwór o stężeniu 100 mg/l (Fig. 1A).

Następny etap obejmował analizę maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II w liściach (Fig. 1B). Deficyt wody w glebie obniżył wartość parametru Fv/Fm, natomiast zastosowanie γ -PGA złagodziło ten negatywny skutek (Fig. 1B). Silniejsze działanie γ -PGA zaobserwowano przy jego aplikacji w 7 dniu trwania stresu, w tym wariantcie odnotowana wartość badanego parametru była wyższa niż u roślin uprawianych w warunkach suszy, jednak nie osiągnęła poziomu występującego w liściach roślin kontrolnych. Roztwór γ -PGA o stężeniu 70 mg/l podany pod koniec trwania suszy zniósł jej efekt, czego nie zaobserwowano po aplikacji roztworu w stężeniu 100 mg/l (Fig. 1B).

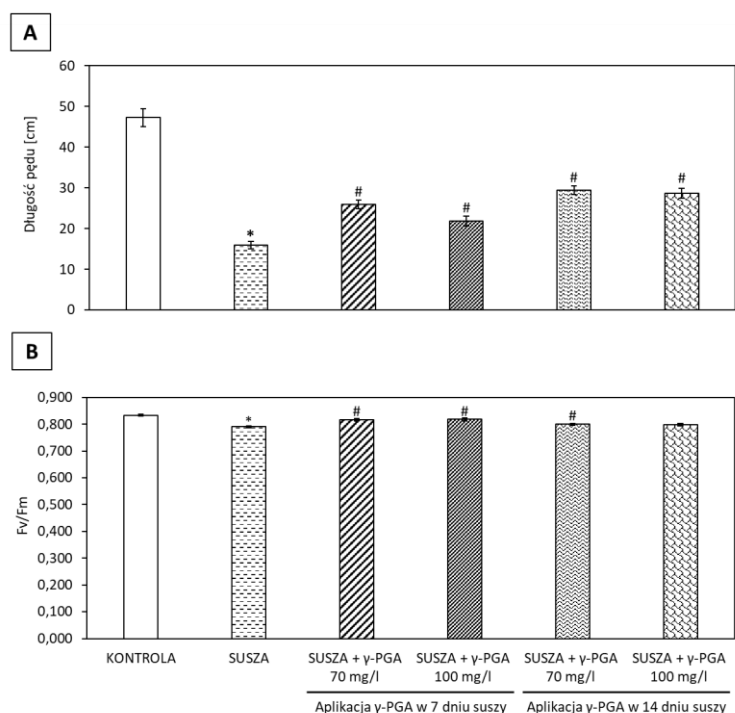


Figura 1. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na długość pędu (A) oraz maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II (Fv/Fm) liści (B) *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 70 mg/l lub 100 mg/l, który aplikowano dogłębowo w 7 lub 14 dniu trwania suszy. Rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Pomiary wykonano w 56 dniu uprawy roślin. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotne statystycznie różnice określono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc Dunn'a. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli * $p < 0,05$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy # $p < 0,05$.

Analiza danych dotyczących wpływu stężenia i czasu aplikacji γ -PGA na nadziemną część *L. luteus* wykazała, że roztwory w obu zastosowanych stężeniach zadziałały z porównywalną efektywnością, natomiast istotnym czynnikiem różnicującym odpowiedź roślin był moment aplikacji. W przypadku długości pędu silniejsze efekty zaobserwowano po zastosowaniu γ -PGA w drugiej połowie okresu suszy, natomiast dla parametru Fv/Fm korzystniejsze rezultaty uzyskano przy podaniu roztworu w pierwszej połowie trwania suszy.

W kolejnym etapie oszacowano wpływ suszy i γ -PGA na rozwój podziemnej części *L. luteus* (Fig. 2). Średnia długość korzeni roślin kontrolnych wyniosła około 10 cm (Fig. 2A). Analiza danych wykazała, że susza doprowadziła do obniżenia wartości badanego parametru o około 7% w porównaniu z kontrolą, przy czym różnice te nie były istotne

statystycznie. Rośliny poddane działaniu γ -PGA w stężeniu 70 mg/l w 7 dniu trwania suszy wytworzyły korzenie o około 20% dłuższe niż rośliny poddane jedynie stresowi. Co ciekawe, w tym samym wariancie czasowym zwiększenie stężenia γ -PGA do 100 mg/l spowodowało dalsze nasilenie obserwowanego efektu. W 14 dniu trwania suszy silniejszy pozytywny efekt wywołał γ -PGA o stężeniu 100 mg/l (Fig. 2A).

W dalszej części analiz określono wpływ γ -PGA na zdolność *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie do tworzenia brodawek korzeniowych. Stres suszy doprowadził do redukcji liczby brodawek korzeniowych o 5 w porównaniu z kontrolą (Fig. 2B). Egzogenny γ -PGA zniwelował negatywny wpływ deficytu wody w glebie, kiedy aplikowano go w 14 dniu trwania stresu. Skuteczniejsze działanie wykazał γ -PGA o niższym stężeniu (70 mg/l) (Fig. 2B).

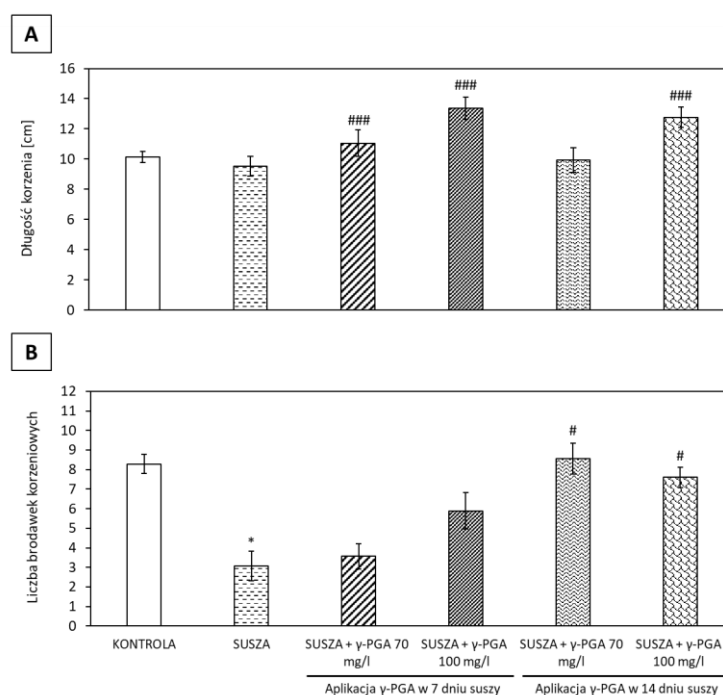


Figura 2. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na długość korzenia (A) oraz liczbę brodawek korzeniowych (B) wytworzonych przez *Lupinus luteus* uprawiany w warunkach suszy glebowej. Rośliny poddawano stresowi suszy (25% pełnej pojemności wodnej gleby, WHC). Wodny roztwór syntetycznego γ -PGA o stężeniu 70 mg/l lub 100 mg/l podawano dogłębowo w 7 lub 14 dniu trwania suszy. Rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Długość korzeni oraz liczbę brodawek określono w 56 dniu uprawy roślin. Przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotność statystyczną oznaczono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc w Tukey'a dla długości korzenia oraz testu post hoc Dunn'a w przypadku liczby wytworzonych brodawek korzeniowych. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli *p < 0,05; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy #p < 0,05, ###p < 0,001.

W dalszych badaniach dotyczących wpływu suszy oraz γ -PGA na podziemną część *L. luteus* określono względną zawartość wody oraz poziom proliny w górnej części korzenia zawierającej brodawki (Fig. 3).

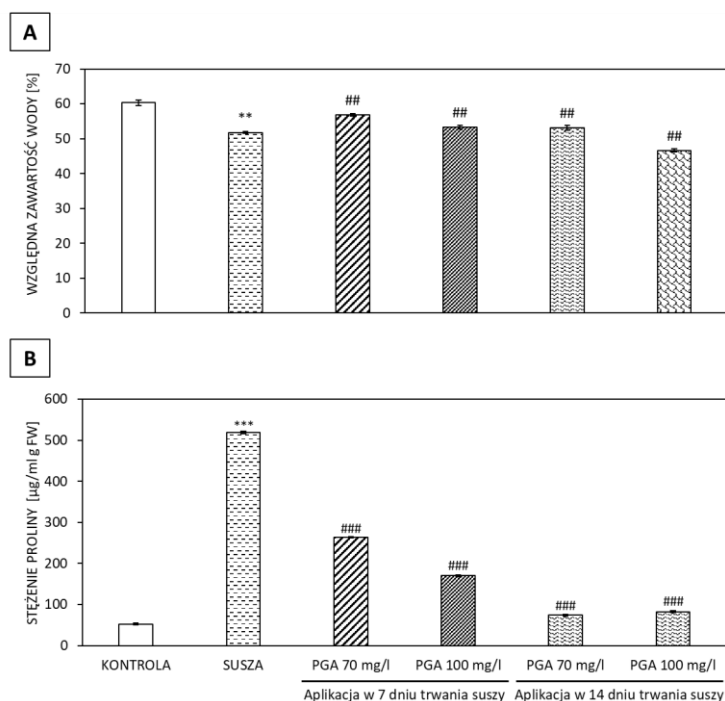


Figura 3. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na względną zawartość wody (RWC) (A) i stężenie proliny (B) w górnej części korzenia *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 70 mg/l lub 100 mg/l, który aplikowano doglebowo w 7 lub 14 dniu trwania suszy. Rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Parametry badano 56 dnia uprawy roślin. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotność statystycznych różnic oceniono za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post hoc Tukey'a. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

Deficyt wody w glebie znalazł odzwierciedlenie w spadku RWC w górnej części korzenia *L. luteus* zawierającej brodawki (Fig. 3A). Korzenie roślin uprawianych w warunkach suszy glebowej charakteryzowały się o około 10% niższą zawartością wody w porównaniu z kontrolą (Fig. 3A). Egzogenny γ -PGA w większości analizowanych wariantów podniósł RWC w korzeniach w sposób zależny od stężenia związku oraz czasu jego aplikacji. Najsilniejszy efekt zaobserwowano po zastosowaniu roztworu o niższym stężeniu, aplikowanego w połowie trwania suszy, kiedy RWC wzrosła o około 5% w

porównaniu z roślinami uprawianymi w warunkach suszy, nietraktowanymi γ -PGA. Roztwór o stężeniu 70 mg/l podany pod koniec trwania stresu zwiększył wartość badanego parametru o około 2%. Podobną tendencję obserwowano po aplikacji γ -PGA o stężeniu 100 mg/l w 7 dniu suszy, jednak ten sam roztwór podany w 14 dniu trwania stresu spowodował spadek RWC w korzeniach do poziomu poniżej 50% (Fig. 3A).

W niniejszej pracy wykazano, że w górnej części korzenia *L. luteus* uprawianego w warunkach optymalnej wilgotności zawartość proliny wyniosła około 500 $\mu\text{g/ml/g FW}$, natomiast stres suszy doprowadził do ponad 10-krotnego wzrostu poziomu tego aminokwasu (Fig. 3B). Roztwór γ -PGA podany roślinom w 7 dniu trwania suszy glebowej obniżył zawartość proliny w korzeniach względem korzeni roślin uprawianych wyłącznie w warunkach stresu o około 49% po zastosowaniu roztworu o stężeniu 70 mg/l i o około 68% po podaniu roztworu o stężeniu 100 mg/l. Jeszcze silniejszy efekt działania γ -PGA zaobserwowano, kiedy aplikowano go w 14 dniu trwania suszy glebowej. W tych warunkach zawartość proliny w korzeniach wyniosła o około 86% mniej niż w korzeniach roślin stresowanych po zastosowaniu roztworu o niższym stężeniu oraz o ponad 84% po zastosowaniu roztworu o stężeniu wyższym (Fig. 3B).

Uzyskane wyniki wskazują, że efekt działania γ -PGA w podziemnej części rośliny był zależny od czasu aplikacji tego związku. Zastosowanie γ -PGA istotnie zwiększało długość korzeni w warunkach stresu wodnego, szczególnie przy dawce 100 mg/l, niezależnie od terminu podania tego związku. Aplikacja γ -PGA łagodziła również negatywny wpływ suszy na proces brodawkowania, przy czym korzystniejsze działanie obserwowano przy podaniu preparatu w 14 dniu suszy, gdzie liczba brodawek korzeniowych zbliżona była do wartości kontrolnych. Jednocześnie γ -PGA wyraźnie ograniczał akumulację proliny względem roślin uprawianych w warunkach suszy, a efekt był silniejszy przy podaniu preparatu w 14 dniu trwania stresu.

Reasumując tę część pracy, pomimo że niższe stężenie γ -PGA w niektórych wariantach czasowych silniej wpływało na wybrane parametry, roztwór o stężeniu 100 mg/l aplikowany w 14 dniu trwania suszy wywołał bardziej kompleksową odpowiedź aklimatyzacyjną obejmującą jednoczesny wzrost długości pędu i korzenia, zwiększenie liczby brodawek korzeniowych, a także obniżenie poziomu proliny. Zaważyło to o wyborze tego wariantu eksperymentalnego do dalszych badań.

4.2. Wpływ γ -PGA na strukturę brodawek korzeniowych *L. luteus* uprawianego w warunkach suszy glebowej

Susza glebowa wywołała wyraźne zmiany histologiczne w brodawkach korzeniowych *L. luteus*, szczególnie w strefie wiązania azotu (Fig. 4C, D). Kluczowe zmiany objęły plazmolizę komórek (Fig. 4C), akumulację licznych agregatów i ziarnistości cytoplazmatycznych oraz wyraźne powiększenie przestrzeni międzykomórkowych (Fig. 4D). Ponadto odnotowano występowanie komórek, w których silniej nagromadzony był barwnik (Fig. 4D). Egzogenny γ -PGA, aplikowany roślinom podczas suszy, istotnie ograniczył wywołane przez stresor zmiany. Obraz histologiczny brodawek korzeniowych roślin traktowanych γ -PGA (Fig. 4E, F) był zbliżony do brodawek roślin kontrolnych (Fig. 4A, B), gdyż protoplast przylegał do ścian komórkowych, a plazmoliza zaszła jedynie w pojedynczych komórkach. Nie stwierdzono również obecności agregatów cytoplazmatycznych (Fig. 4E, F). Co więcej, komórki strefy wiązania azotu zawierały większą liczbę bakterii symbiotycznych (Fig. 4F) w porównaniu z brodawkami roślin poddanych wyłącznie stresowi suszy (Fig. 4D).

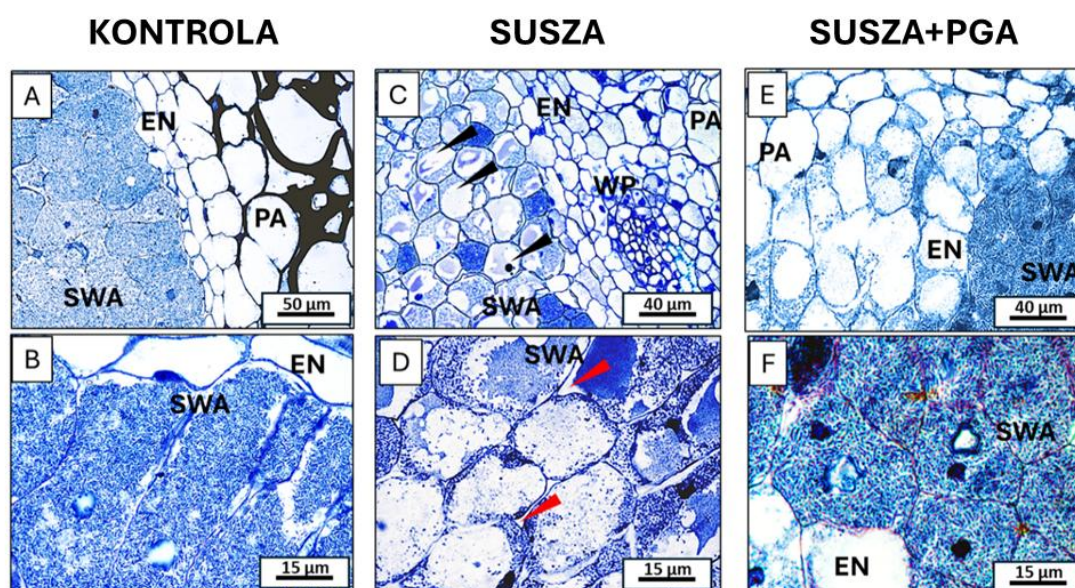


Figura 4. Wpływ stresu suszy glebowej oraz kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na strukturę brodawek korzeniowych *Lupinus luteus*. Rośliny kontrolne uprawiano w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Jednocześnie część roślin była poddawana warunkom suszy przez 2 tygodnie (25% WHC). Po tym czasie grupie roślin narażonych na działanie stresora podawano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l). Dla wszystkich wariantów fragmenty tkanek preparowano w 56 dniu uprawy roślin. Zdjęcia B, D, F są powiększeniami regionów pokazanych odpowiednio na A, C, E. Czarnymi strzałkami oznaczono splazmolizowane komórki. Czerwone strzałki wskazują na zwiększone przestrzenie międzykomórkowe. Skróty: EN – endoderma, PA – parenchyma, WP – wiązka przewodząca, SWA – strefa wiązania azotu. Preparaty barwiono 0,05% roztworem błękitu toluidyny. Wartości skali przedstawiono na każdym zdjęciu.

W celu kompleksowej oceny wpływu suszy i γ -PGA na zmiany zachodzące w brodawkach korzeniowych *L. luteus* przeprowadzono analizę ultrastrukturalną (Fig. 5A–I). Na podstawie zdjęć stwierdzono obecność dużych jąder komórkowych, cienkiej ściany komórkowej (Fig. 5A), a także dużych wakuoli oraz ziaren skrobi w warunkach kontrolnych (Fig. 5B). Ściany komórkowe roślin poddanych suszy były grubsze niż w kontroli (Fig. 5E). Zaobserwowano także degradację mitochondriów (Fig. 5D).

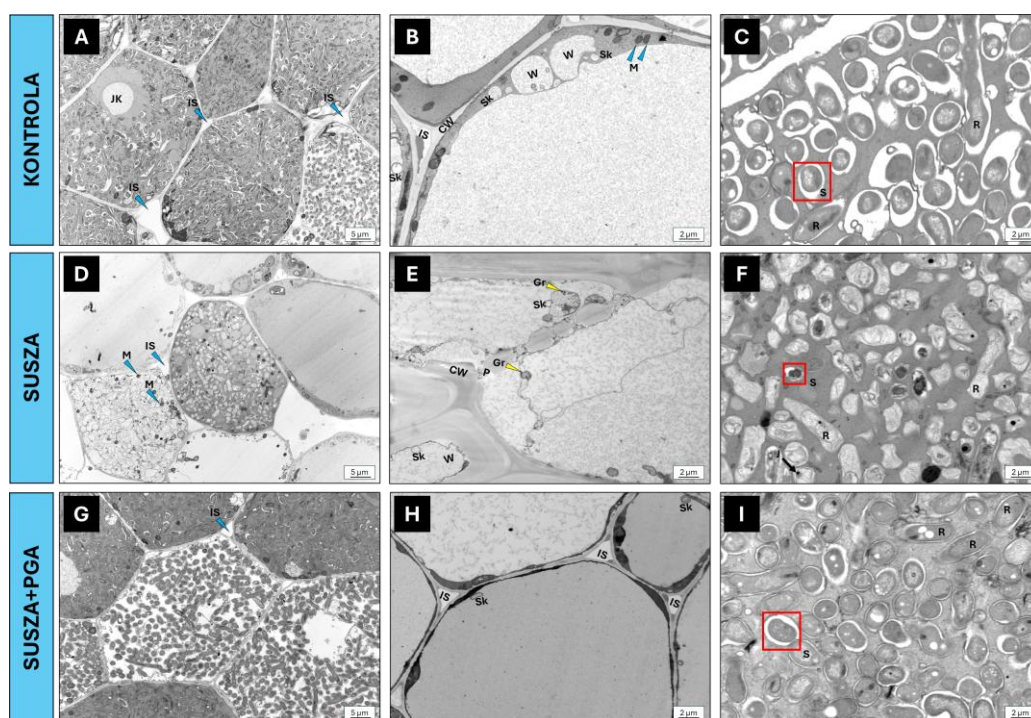


Figura 5. Wpływ suszy glebowej i kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na ultrastrukturę brodawek korzeniowych *Lupinus luteus*. Rośliny kontrolne uprawiano w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Część roślin uprawiano przez 2 tygodnie w warunkach suszy (25% WHC), po tym czasie połowie z nich zaaplikowano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l). Fragmenty tkanek preparowano w 56 dniu uprawy roślin dla wszystkich wariantów. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, na których przedstawiono komórki strefy wiązania azotu (A, D, G), endodermis (B, E, H). Zdjęcia C, F i I stanowią powiększenia zdjęć odpowiednio A, D, G. Czerwonymi prostokątami zaznaczono symbiosomy. Zastosowane skróty: CW – ściana komórkowa, S – symbiosom, P – plazmodesma, R – *Rhizobium*, IS – przestrzeń międzykomórkowa, M – mitochondrium, Gr – ziarnistości, W – wakuola, JK – jądro komórkowe, J – jąderko, Sk – skrobia.

Wykazano, że deficyt wody w glebie prowadził w komórkach endodermis do wyraźnej kondensacji cytoplazmy, w obrębie której obserwowano elektronowo gęste, liczne ziarnistości (Fig. 5E). Stwierdzono również zmniejszenie przestrzeni międzykomórkowych (Fig. 5D, E). Największe zmiany ultrastrukturalne zaszły w komórkach strefy wiązania azotu (Fig. 5F). Symbiosomy utraciły regularny,

charakterystyczny dla kontroli kształt, były wyraźnie skurczone i zdeformowane (Fig. 5F). Jednocześnie odnotowano ich zmniejszoną liczbę, a obecne w nich rizobia wykazały nieregularną morfologię świadczącą o degeneracji (Fig. 5F). Zastosowanie γ -PGA u roślin uprawianych w warunkach deficytu wody w glebie ograniczyło opisane zmiany (Fig. 5G, H, I). W ich brodawkach symbiosomy zachowały strukturę zbliżoną do tej obserwowanej w warunkach kontrolnych i nie wykazały oznak deformacji (Fig. 5I, G). Cytoplazma była jednorodna i pozbawiona ziarnistości. Ściany komórkowe były znacznie cieńsze (Fig. 5H) w porównaniu z komórkami brodawek roślin poddanych wyłącznie działaniu suszy.

Podsumowując, susza glebowa doprowadziła do istotnych zmian histologicznych i ultrastrukturalnych w brodawkach korzeniowych *L. luteus*, szczególnie w strefie wiązania azotu, a zastosowanie γ -PGA ograniczyło te modyfikacje, umożliwiając utrzymanie prawidłowej organizacji brodawek.

4.3. Gospodarka redoks w korzeniach *L. luteus* w warunkach suszy i po zastosowaniu γ -PGA

Dotychczas w korzeniach *L. luteus* zaobserwowano zależność pomiędzy działaniem suszy a poziomem H_2O_2 oraz aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (Wilmowicz i wsp. 2019, 2020). W celu oceny zdolności γ -PGA do przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu indukowanemu suszą, a także określenia zmian zachodzących w tkankach korzenia niezwiązanych bezpośrednio z symbiozą z bakteriami, dalsze etapy badań prowadzono na górnej części korzenia, pozbawionej brodawek. Jako pierwszą przeprowadzono analizę zawartości H_2O_2 (Fig. 6). Susza doprowadziła do znaczącego wzrostu poziomu H_2O_2 w korzeniach *L. luteus*, który był ponad trzykrotnie wyższy w odniesieniu do korzeni roślin kontrolnych. Egzogenny γ -PGA istotnie zmniejszył akumulację H_2O_2 w korzeniach roślin poddanych suszy, obniżając jego poziom niemal do tego, który obserwowano u roślin kontrolnych (Fig. 6).

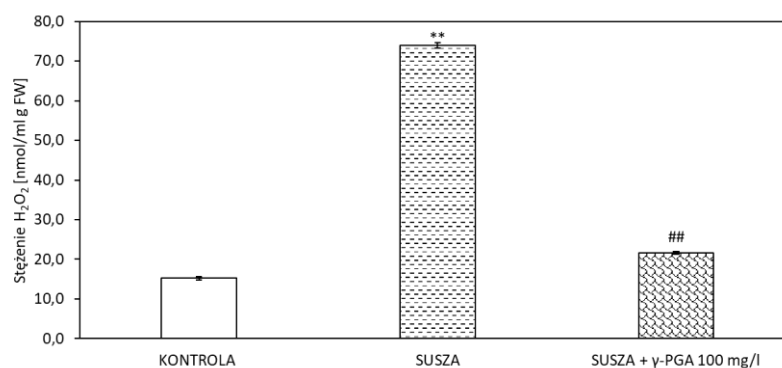


Figura 6. Poziom nadtlenu wodoru (H₂O₂) w górnej części korzeni *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie oraz po aplikacji kwasu poli-γ-glutaminowego (γ-PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ-PGA o stężeniu 100 mg/l, który aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Materiał do analizy (górną część korzeni bez brodawek korzeniowych) zbierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ-PGA względem suszy ## $p < 0,01$ (test t-Studenta).

Jednym z głównych celów RFT są wielonienasycone kwasy tłuszczowe obecne w fosfolipidach błon biologicznych. Ich degradacja prowadzi do powstawania nadtlenu lipidowych, które następnie ulegają rozkładowi do związków o mniejszej masie cząsteczkowej, w tym aldehydów o wysokiej reaktywności chemicznej (Alaya i wsp. 2014). Pośród najczęściej stosowanych biomarkerów intensywności peroksydacji lipidów jest MDA. Mając na celu ocenę wpływu γ-PGA na stabilność dwuwarstwy lipidowej w korzeniu *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie, oznaczono zawartość MDA (Fig. 7). Roztwór γ-PGA spowodował blisko 50% obniżenie poziomu tego markera w porównaniu z korzeniami roślin poddanych działaniu suszy, choć wartość ta nadal pozostała o ok. 1 nmol/ml wyższa niż w korzeniach roślin kontrolnych (Fig. 7).

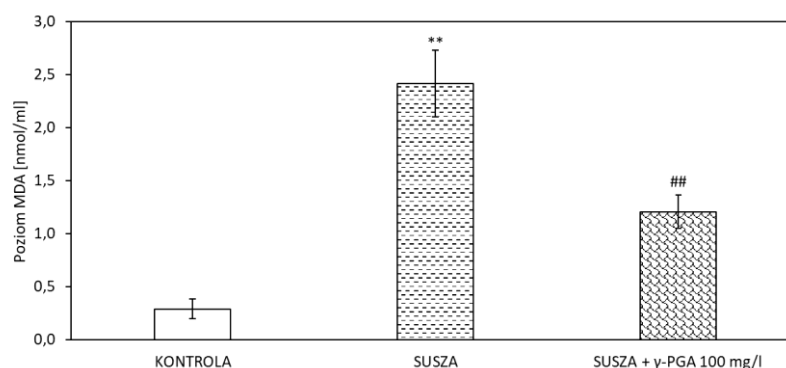


Figura 7. Poziom dialdehydu malonowego (MDA) w korzeniach *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie oraz po aplikacji kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*); rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 100 mg/l, który aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Materiał do analizy (górną część korzeni bez brodawek korzeniowych) zbierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ## $p < 0,01$ (test t-Studenta) (test t-Studenta).

W kolejnym kroku przeprowadzono analizę aktywności CAT w górnej części korzeni *L. luteus* w warunkach suszy oraz po zastosowaniu γ -PGA. Korzenie roślin kontrolnych wykazały najniższą aktywność CAT, wynoszącą około 5,1 U/mg białka (Fig. 8A). W korzeniach roślin poddanych suszy odnotowano wyraźny wzrost aktywności CAT do około 6,6 U/mg białka. Z kolei w wariancie, w którym rośliny uprawiano w warunkach deficytu wody w glebie i jednocześnie traktowano γ -PGA, aktywność enzymu utrzymała się na poziomie zbliżonym do wartości obserwowanej u roślin stresowanych (około 6,45 U/mg białka) (Fig. 8A).

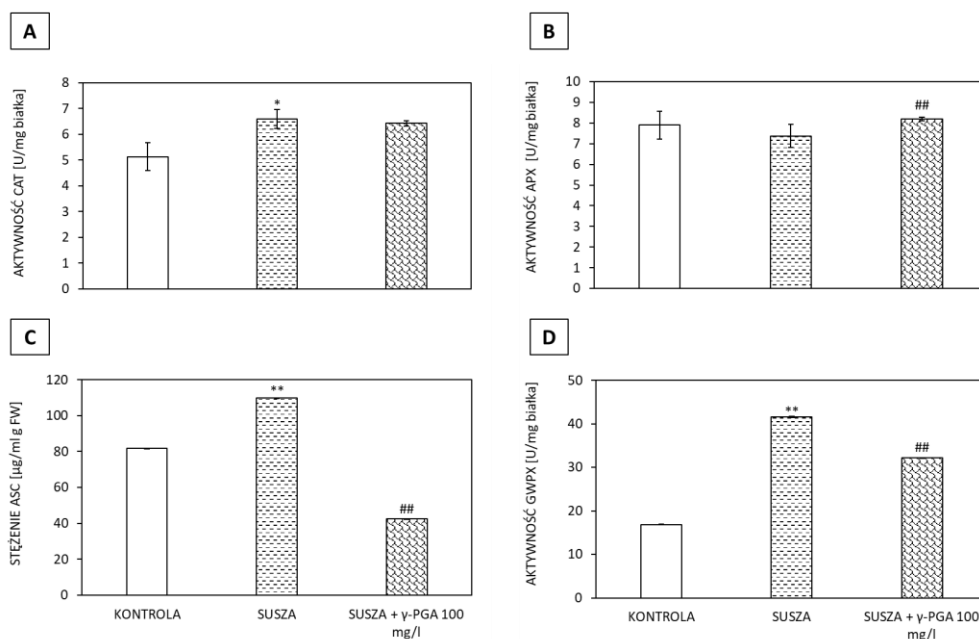


Figura 8. Aktywność katalazy (CAT) (A), peroksydazy askorbinianowej (APX) (B), peroksydazy gwajakolowej (GWPX) (D) oraz poziom kwasu askorbinowego (ASC) (C) w górnej części korzenia *Luteus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody oraz po aplikacji kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 100 mg/l aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Materiał (górną część korzenia bez brodawek korzeniowych) zbierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ## $p < 0,01$ (test t-Studenta).

Jednym z ważnych mechanizmów obronnych roślin przed skutkami stresu oksydacyjnego jest zwiększenie syntezy ASC (Akram i wsp. 2017), który pełni rolę donora elektronów w reakcji katalizowanej przez APX, odpowiedzialnej za rozkład H_2O_2 do H_2O (Shigeoka i wsp. 2002). Deficyt wody w glebie wywołał wyraźny, bo ponad 30% wzrost stężenia ASC w korzeniach w porównaniu z roślinami kontrolnymi (Fig. 8B). Odmienny efekt zaobserwowano po zastosowaniu roztworu γ -PGA. W tym wariancie stężenie ASC było niższe o około 61% w odniesieniu do roślin stresowanych i o około 48% niższe w porównaniu z kontrolą. Roztwór γ -PGA prowadził do wzrostu aktywności APX o ponad 11% względem suszy (Fig. 8C).

Na dalszym etapie badań przeanalizowano aktywność enzymatyczną GWPX, enzymu odpowiedzialnego za redukcję H_2O_2 z utlenianiem gwajakolu. W korzeniach

roślin uprawianych w optymalnych warunkach aktywność GWPX utrzymywała się na poziomie około 17 U/mg białka, natomiast w warunkach suszy gwałtownie wzrosła, osiągając wartość ponad dwukrotnie wyższą niż w kontroli (Fig. 8D). Zastosowanie roztworu γ -PGA u roślin uprawianych w warunkach suszy obniżyło aktywność tego enzymu do około 32,5 U/mg białka.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że susza wywołała w korzeniach *L. luteus* stres oksydacyjny, przejawiający się wzrostem zawartości H_2O_2 , nasileniem peroksydacji lipidów oraz uruchomieniem enzymatycznego i nieenzymatycznego systemu ochrony przed RFT. Zastosowanie γ -PGA ograniczyło peroksydację lipidów i obniżyło aktywność GWPX i APX oraz poziom ASC, co wskazuje na udział tego polimeru w regulacji równowagi redoks w korzeniach roślin poddanych stresowi suszy.

4.4. Wpływ γ -PGA na strukturę ścian komórkowych brodawek korzeniowych *L. luteus* w warunkach suszy glebowej

Wywołany przez suszę stan stresu oksydacyjnego modyfikuje strukturę ściany komórkowej, co jest skutkiem modulowania poziomu jej poszczególnych składników, w tym nisko- i wysokometylowanych pektyn (Leucci i wsp. 2008). Wyniki barwienia tkanek czerwienią rutenową dostarczyły informacji na temat zmian stopnia estryfikacji metylowej pektyn w brodawkach korzeniowych *L. luteus* w odpowiedzi na suszę i γ -PGA (Fig. 9A-F). Ściany komórkowe brodawek korzeniowych roślin uprawianych w warunkach suszy charakteryzowały się podobną intensywnością zabarwienia czerwienią rutenową co kontrola, wskazują na zbliżoną zawartość deestryfikowanych pektyn (Fig. 9). W obu badanych wariantach nagromadzenie niskometylowanych pektyn wystąpiło w ścianach komórkowych parenchymy. Zastosowanie γ -PGA w stężeniu 100 mg/l (Fig. 9E, F) spowodowało radykalną zmianę obrazu histologicznego; odnotowano intensywne, ciemnoróżowe zabarwienie ścian komórkowych, szczególnie w obrębie komórek parenchymy i endodermy, co świadczy o masowej akumulacji niskometylowanych pektyn.

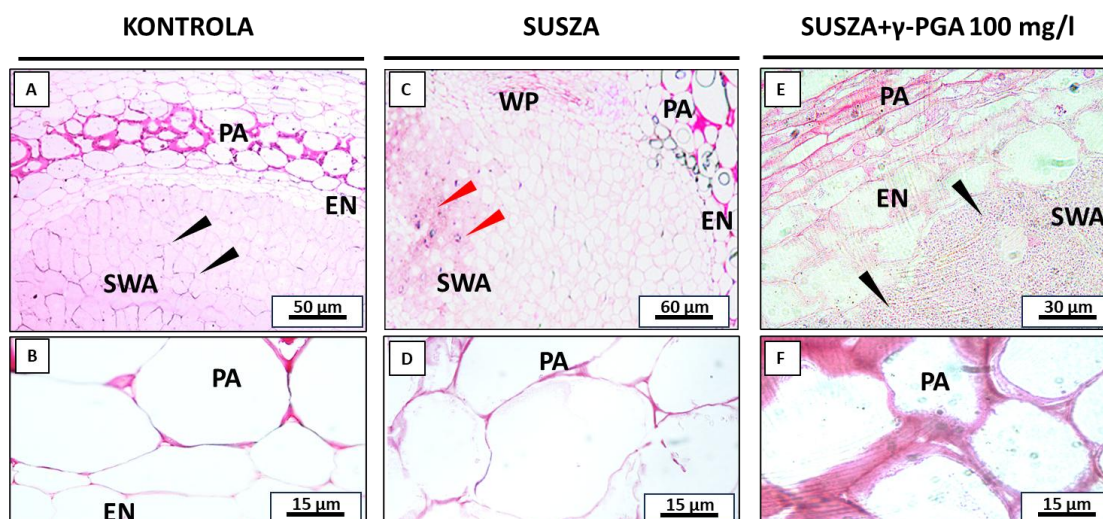


Figura 9. Obrazy mikroskopowe przedstawiające rozmieszczenie niskometylowanych pektyn w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianych w warunkach suszy glebowej i traktowanych kwasem poli- γ -glutaminowym (γ -PGA). Rośliny kontrolne uprawiano w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Jednocześnie część roślin poddano warunkom suszy przez 2 tygodnie (25% WHC). Po tym czasie części roślin wystawionych na działanie stresora podawano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l). Fragmenty tkanek preparowano w 56 dniu uprawy dla wszystkich wariantów. Zdjęcia B, D, F są powiększeniami zdjęć odpowiednio A, C, E. Skróty: EN – endoderma, PA – parenchyma, SWA – strefa wiązania azotu, WP – wiązki przewodzące. Preparaty barwiono z wykorzystaniem 0,05% (w/v) roztworu czerwieni rutenowej. Czarnymi grotami oznaczono wyglądające prawidłowo komórki strefy wiązania azotu, z kolei czerwone groty wskazują komórki SWA ulegające procesom degradacyjnym w trakcie suszy glebowej.

W celu dalszej oceny wpływu suszy glebowej oraz γ -PGA na polisacharydy ściany komórkowej, oznaczono ogólną zawartość pektyn w górnej części korzenia pozbawionej brodawek. Analiza wykazała, że uprawa roślin w warunkach deficytu wody w glebie doprowadziła do istotnego wzrostu poziomu pektyn w korzeniach, który był wyższy o ponad 120% w porównaniu z roślinami kontrolnymi (Fig. 10). Zastosowanie roztworu γ -PGA u roślin poddanych suszy obniżyło zawartość pektyn o około 13% względem wariantu stresowego (Fig. 10).

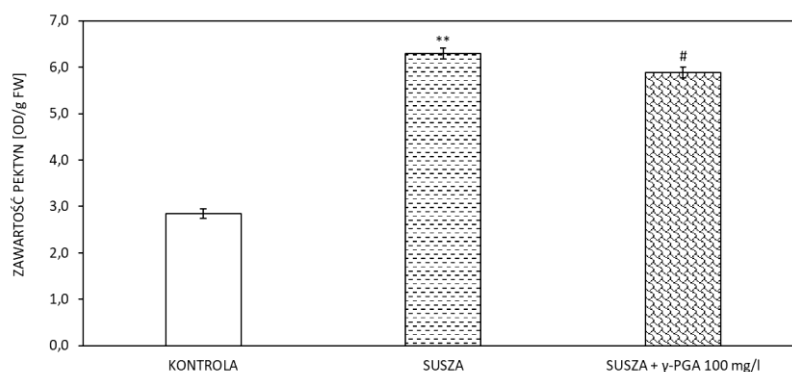


Fig. 10. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) oraz suszy glebowej na zawartość pektyn w korzeniach *Lupinus luteus*. Rośliny uprawiano w warunkach niedoboru wody (25% WHC), natomiast rośliny kontrolne uprawiano w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Roztwór γ -PGA aplikowano w 49 dniu uprawy (14 dzień działania stresora). Materiał do analiz (górna część korzenia pozbawiona brodawek korzeniowych) pobierano w 56 dniu uprawy. Całkowita zawartość pektyn została określona na podstawie absorbancji pektyn. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SE (n = 3). Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli **p < 0,01; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy #p < 0,05 (test t-Studenta).

Następnie wykonano analizę dot blot, która umożliwiła ilościowe określenie wybranych klas pektyn przy użyciu specyficznych przeciwciał. Sygnał po reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko nisko-(31-40%) i niemetylowanym HG (JIM5) oraz wysokometylowanym (15-80%) pektynom (JIM7) był wyższy w brodawkach roślin uprawianych w warunkach deficytu wody w porównaniu z kontrolą odpowiednio o ponad 116% i niemal 39% (Fig. 11). Zastosowanie egzogenego γ -PGA obniżyło zawartość zarówno nisko-, jak i wysokometylowanych pektyn w porównaniu z roślinami uprawianymi w warunkach suszy (Fig. 11). W przypadku JIM5 zarejestrowany sygnał był około 16% wyższy w odniesieniu do roślin kontrolnych, natomiast jeszcze silniejszy efekt zastosowania γ -PGA zaobserwowano dla JIM7, gdzie zawartość antygeny spadła około 14% poniżej wartości kontrolnej.

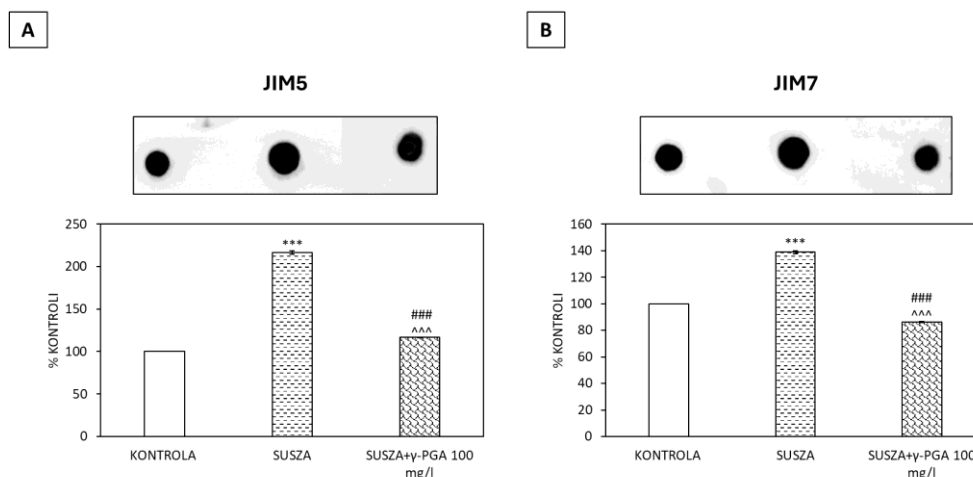


Figura 11. Akumulacja antygenów pektynowych w korzeniach *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach suszy glebowej oraz traktowanego kwasem poli- γ -glutaminowym (γ -PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy rosły w glebie o 25% pełnej pojemności wodnej (WHC), natomiast kontrolę stanowiły rośliny uprawiane w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 100 mg/l, aplikowany doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Ekstrakty białkowe, uzyskane z górnej części korzenia pozbawionej brodawek korzeniowych i zebrane z 56-dniowych roślin, wykorzystano do testu dot blot. Do każdej reakcji użyto 2,5 μ g białka. Zastosowano przeciwciała JIM5 i JIM7, pozwalające na wykrycie odpowiednio nisko- i wysokometylowanych pektyn. Membrany po detekcji poddano analizie densytometrycznej przy użyciu oprogramowania ImageJ. Wartości wyrażono jako % kontroli, dla której przyjęto wartość 100%. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotne statystycznie różnice określono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc Tuckey'a. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli *** $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ### $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem kontroli ^^^ $p < 0,001$.

W kolejnym etapie zbadano wpływ suszy i γ -PGA na ramnogalakuronany typu I (galaktany, arabinany) oraz XGA w korzeniach *L. luteus*. Test dot blot z użyciem przeciwciał LM5, LM6 i LM8 (Fig. 12) wykazał, że sygnał we wszystkich reakcjach był silniejszy dla ekstraktów uzyskanych z korzeni roślin stresowanych w porównaniu z kontrolą (Fig. 12). Analiza densytometryczna ujawniła istotne zmiany w zawartości badanych epitopów ściany komórkowej w odpowiedzi na stres suszy oraz traktowanie γ -PGA. W warunkach suszy stwierdzono istotny 30% wzrost poziomu epitopu LM5 względem kontroli (Fig. 12A). Zastosowanie γ -PGA w warunkach stresu spowodowało częściowe obniżenie poziomu tego epitopu (o ok. 10%), jednak wartość ta nadal pozostawała wyższa niż w roślinach kontrolnych. W przypadku LM6 odnotowano

silniejszą reakcję na suszę. Intensywność sygnału wzrosła o ok. 100% w porównaniu z kontrolą (Fig. 12B). Traktowanie γ -PGA istotnie zredukowało efekt wywołany stresem, prowadząc do obniżenia siły sygnału o ok. 70%. Podobną tendencję zaobserwowano dla epitopu LM8 (Fig. 12C). Susza powodowała ponad dwukrotny wzrost poziomu XGA w porównaniu z kontrolą, natomiast aplikacja γ -PGA istotnie obniżała ich zawartość względem roślin poddanych wyłącznie suszy do poziomu około 40% wyższego niż w kontroli.

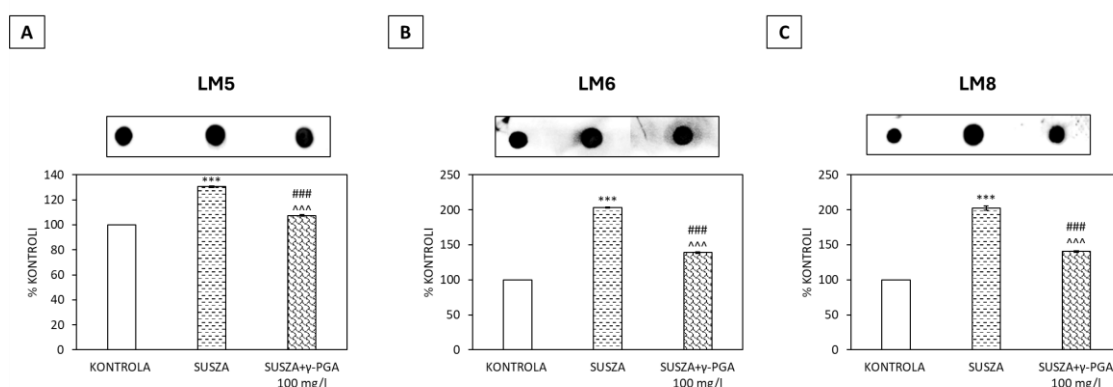


Figura 12. Wpływ suszy i kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na zawartość ramnogalakturonanów typu I oraz XGA w korzeniach *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody. W badaniu wykorzystano przeciwciała rozpoznające poszczególne typy ramnogalakturonanów: LM5 – β -1,4-galaktany; LM6 – α -1,5-arabinany; oraz XGA – LM8. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, *ang. water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA o stężeniu 100 mg/l, aplikowany doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Materiał (górną część korzenia bez brodawek korzeniowych) pobierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Analizy densytometryczne wykonano przy pomocy programu ImageJ. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotne statystyczne różnice określono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc Tuckeya. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli *** $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ### $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem kontroli ^^^ $p < 0,001$.

Najbardziej rozpowszechnionymi składnikami hemiceluloz w ścianie komórkowej roślin są XyG (Höfte i Voxeur 2017). W celu oceny wpływu γ -PGA oraz suszy na ich zawartość przeprowadzono reakcje dot blot z użyciem przeciwciał LM15 (ksylozylowane ksyloglukany), LM24 (rozpoznającego motyw XLLG) i LM25 (wykrywającego acetylowane XyG) (Fig. 13).

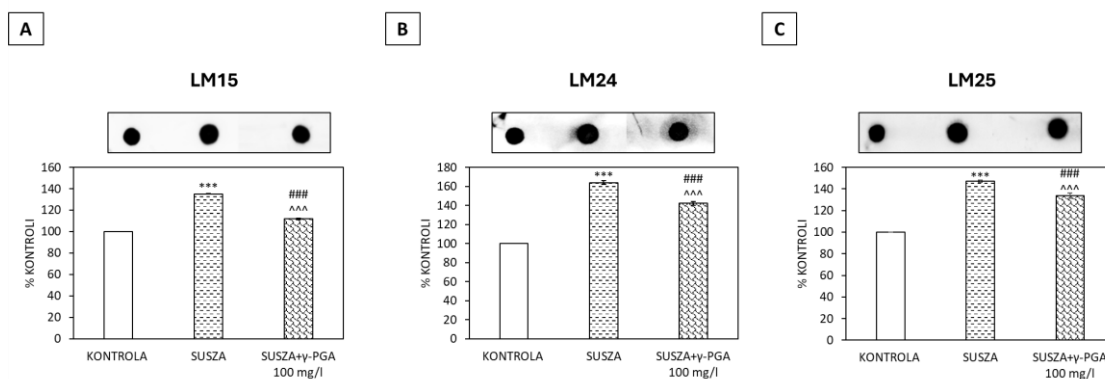


Figura 13. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) oraz deficytu wody w glebie na zawartość ksyloglukanów w korzeniach *Lupinus luteus*. Rośliny stresowane uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), a rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) o stężeniu 100 mg/l aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Zastosowano przeciwciała monoklonalne LM15, LM24 i LM25 do wykrywania ksyloglukanów oraz ich specyficznych motywów (XXXG, XLLG). Materiał (górną część korzenia bez brodawek korzeniowych) pobierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Analizy densytometryczne wykonano przy pomocy programu ImageJ. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotne statystycznie różnice określono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc Tuckey'a. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli *** $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ### $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem kontroli ^^ $p < 0,001$.

W reakcjach dot blot ze wszystkimi przeciwciałami (Fig. 13A–C) ekspozycja roślin na deficyt wody skutkowała gwałtownym i statystycznie istotnym wzrostem intensywności sygnału wskazującego na obecność XyG w porównaniu z kontrolą. Najsilniejszą odpowiedź odnotowano dla epitopu rozpoznawanego przez LM24 (Fig. 13B), gdzie intensywność sygnału wzrosła do ok. 65% względem kontroli. W przypadku epitopów LM15 (Fig. 13A) oraz LM25 (Fig. 13C) akumulacja ta była nieco niższa (odpowiednio ok. 35% i 48%). Zastosowanie γ -PGA w warunkach stresowych spowodowało istotne obniżenie poziomu analizowanych XyG w porównaniu z wariantem poddanym wyłącznie suszy. Dla wszystkich epitopów siła sygnału spadła o ok. 20% względem suszy.

4.5. Wpływ suszy glebowej i γ -PGA na czynniki molekularne regulujące powstawanie i funkcjonowanie brodawek korzeniowych

Deficyt wody w glebie zmniejsza ekspresję genu *LIBOP* związanego z powstawaniem i funkcjonowaniem brodawek korzeniowych *L. luteus* (Frankowski i wsp. 2014, Wilmowicz i wsp. 2019). W związku z tym, w kolejnym etapie badano, czy γ -PGA wpływa na aktywność transkrypcyjną tego genu w brodawkach korzeniowych roślin uprawianych w warunkach suszy glebowej (Fig. 14). Podanie tego związku spowodowało istotny wzrost poziomu mRNA *LIBOP* względem roślin stresowanych, jednak jego wartość stanowiła 85% tej, którą odnotowano w kontroli (Fig. 14).

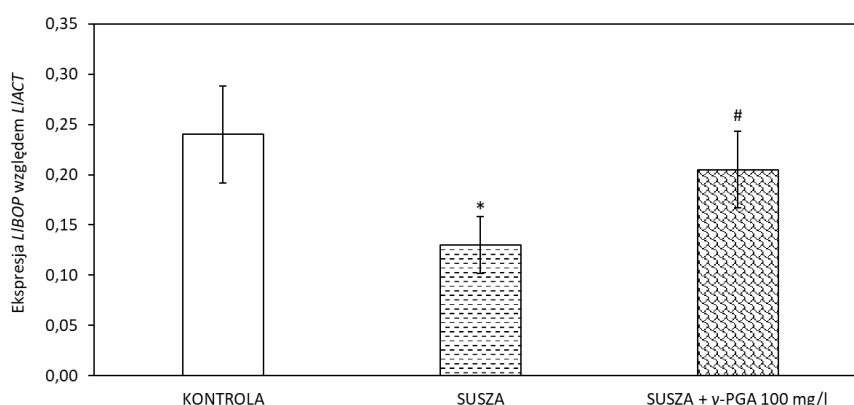


Figura 14. Poziom mRNA genu *LIBOP* w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody i traktowanego kwasem poli- γ -glutaminowym (γ -PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l), aplikowany doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe pobierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli * $p < 0,05$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy # $p < 0,05$ (test t-Studenta).

Wyniki wcześniejszych analiz wskazują, że susza glebowa moduluje aktywność transkrypcyjną genu *LILbl* (Wilmowicz i wsp. 2020), kodującego leghemoglobinę. W związku z tym, w kolejnym etapie sprawdzono wpływ γ -PGA na ekspresję genu *LILbl* w brodawkach korzeniowych. Maksymalną wartość obserwowano u roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby (Fig. 15), natomiast stres suszy doprowadził do silnego 15-krotnego spadku aktywności transkrypcyjnej badanego genu. Zastosowanie γ -PGA nie przywróciło poziomu jego ekspresji do wartości odnotowanych w kontroli, ale zmniejszyło spadek obserwowany u roślin stresowanych (Fig. 15).

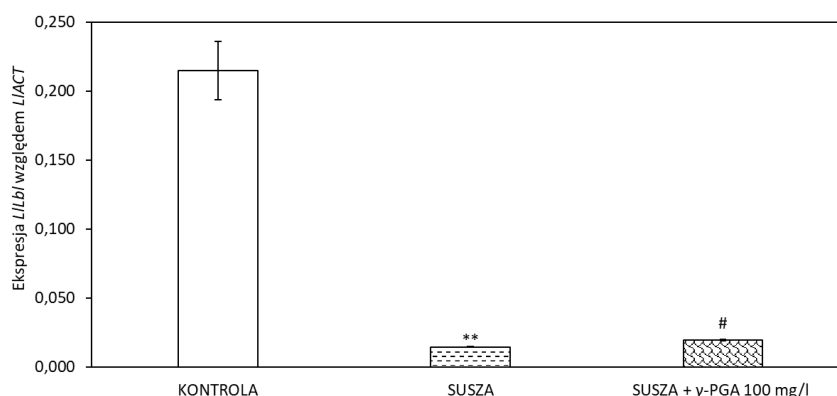


Figura 15. Poziom mRNA genu *LILb1* w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody oraz traktowanego kwasem poli- γ -glutaminowym (γ -PGA). Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l), aplikowany doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe pobierano w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy # $p < 0,05$ (test t-Studenta).

4.6. Wpływ γ -PGA na przemiany hormonalne zachodzące w brodawkach korzeniowych *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie

4.6.1. Kwas abscysynowy

W brodawkach korzeniowych *L. luteus* w warunkach suszy glebowej wzrasta poziom mRNA genu *LIZEP*, kodującego enzym katalizujący jeden z etapów biosyntezy ABA, przy jednoczesnej akumulacji tego fitohormonu (Wilmowicz i wsp. 2019). Wyniki uzyskane po traktowaniu *L. luteus* roztworem γ -PGA podczas działania suszy wykazały, że obniża on aktywność transkrypcyjną genu *LIZEP* zarówno w odniesieniu do brodawek korzeniowych roślin stresowanych, jak i kontrolnych (Fig. 16A). Obserwacje te uzupełniono o analizy immunocytochemiczne, które umożliwiły określenie tkankowej lokalizacji ABA (Fig. 16B).

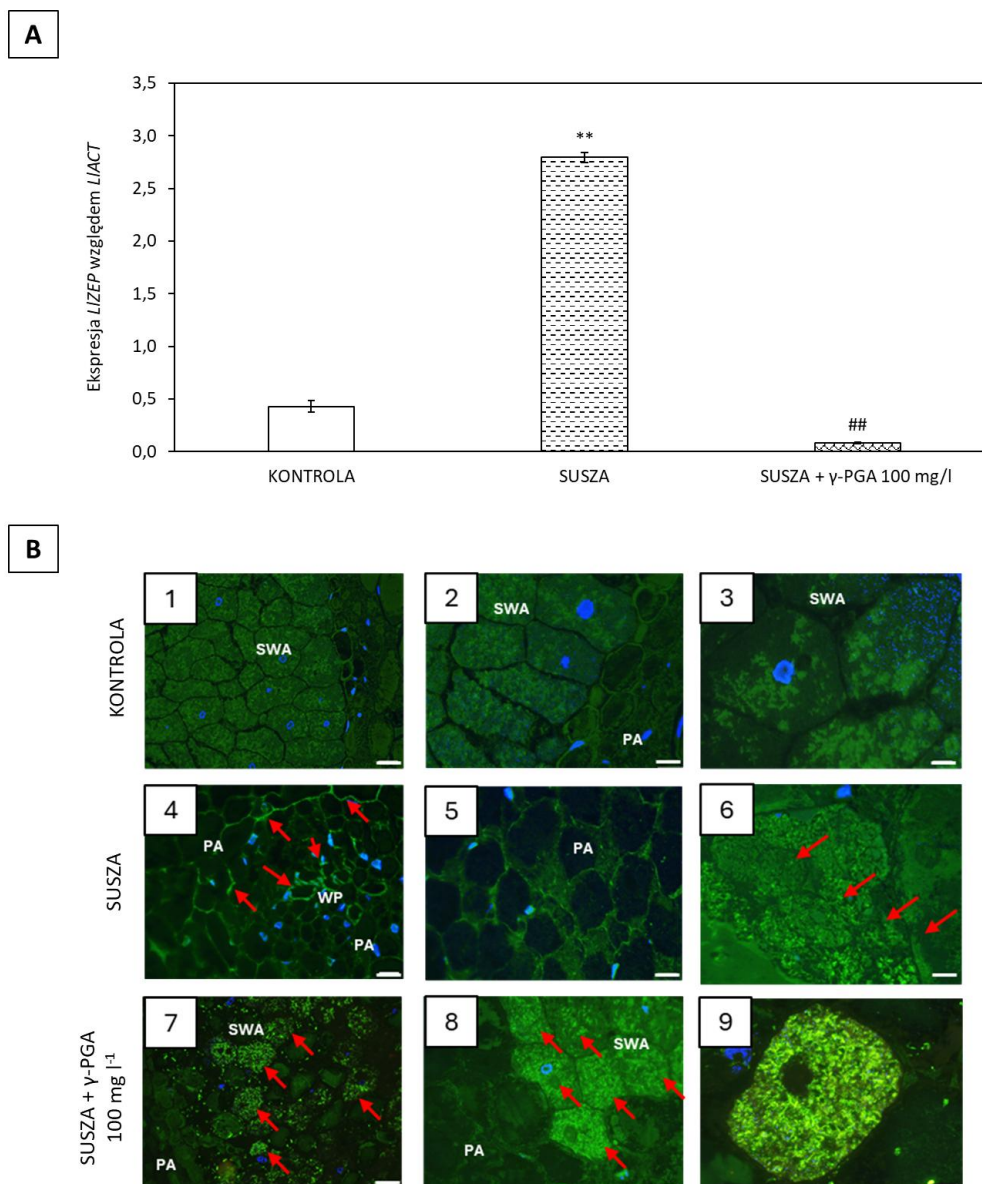


Figura 16. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na aktywność transkrypcyjną genu *LIZEP* (A) oraz lokalizację kwasu abscysynowego (B) w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Zastosowano wodny roztwór γ -PGA (100 mg/l), aplikowany doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe pobierano do analiz w 56 dniu uprawy roślin (7 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ## $p < 0,01$ (test t-Studenta). Reakcje immunocytochemiczne przeprowadzano z wykorzystaniem przeciwciała anti-ABA. Czerwone strzałki wskazują obecność sygnału (zielona fluorescencja). Do wizualizacji jąder użyto DAPI (kolor niebieski). SWA - strefa wiązania azotu, PA - parenchyma, WP - wiązka przewodząca. Bary: 100 μ m w B1, B4, B7, 40 μ m w B2, B5, B8, 20 μ m B3, B6, B9.

W strefie wiązania azotu brodawek korzeniowych roślin kontrolnych nie zaobserwowano silnego sygnału fluorescencyjnego wskazującego na obecność ABA (Fig. 16 B1, 2, 3). Z kolei w brodawkach korzeniowych roślin poddanych suszy glebowej hormon zgromadził się głównie w okolicy wiązek przewodzących, komórkach parenchymy (Fig. 16B4) oraz komórkach strefy wiązania azotu (Fig. 16B6). W roślinach uprawianych w warunkach suszy i traktowanych γ -PGA intensywny sygnał w postaci rozproszonych skupisk występował w strefie wiązania azotu, przy czym wzorec jego rozmieszczenia był odmienny niż w warunkach suszy (Fig. 16B7, 8, 9).

4.6.2. Etylen

Susza glebowa promuje biosyntezę hormonu stresowego – ET (Wilmowicz i wsp. 2019). Wyniki analiz wykazały, że γ -PGA wpływał na aktywność transkrypcyjną *LIACS* i *LIACO* w brodawkach korzeniowych w warunkach suszy glebowej. W tym wariancie poziom mRNA *LIACS* wzrósł ponad dwukrotnie w stosunku do roślin kontrolnych (Fig. 17A).

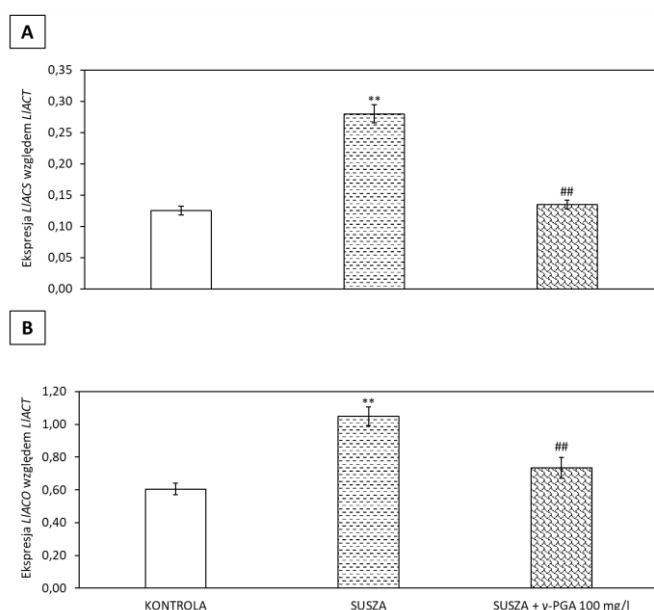


Figura 17. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na poziom mRNA genu *LIACS* i *LIACO* w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ -PGA w stężeniu 100 mg/l aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe zbierano w 56 dniu uprawy roślin (5 dni po zakończeniu działania stresora). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ -PGA względem suszy ## $p < 0,01$ (test t-Studenta).

Z kolei γ -PGA zniwelował efekt suszy, obniżając jego ekspresję do wartości obserwowanej w kontroli (Fig. 17A). Deficyt wody w glebie doprowadził do istotnego wzrostu aktywności transkrypcyjnej *LIACO*, przekraczającego o ponad 70% ten, który odnotowano w brodawkach korzeniowych roślin uprawianych w optymalnych warunkach. Roztwór γ -PGA obniżył ekspresję *LIACO* o około 30% względem wariantu stresowego, jednak nadal była ona o ponad 20% wyższa, niż w brodawkach korzeniowych roślin kontrolnych (Fig. 17B).

W celu lepszego zrozumienia wpływu γ -PGA na szlak biosyntezy ET u *L. luteus* przeprowadzono analizy immunocytochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał umożliwiających detekcję ACC (Fig. 18).

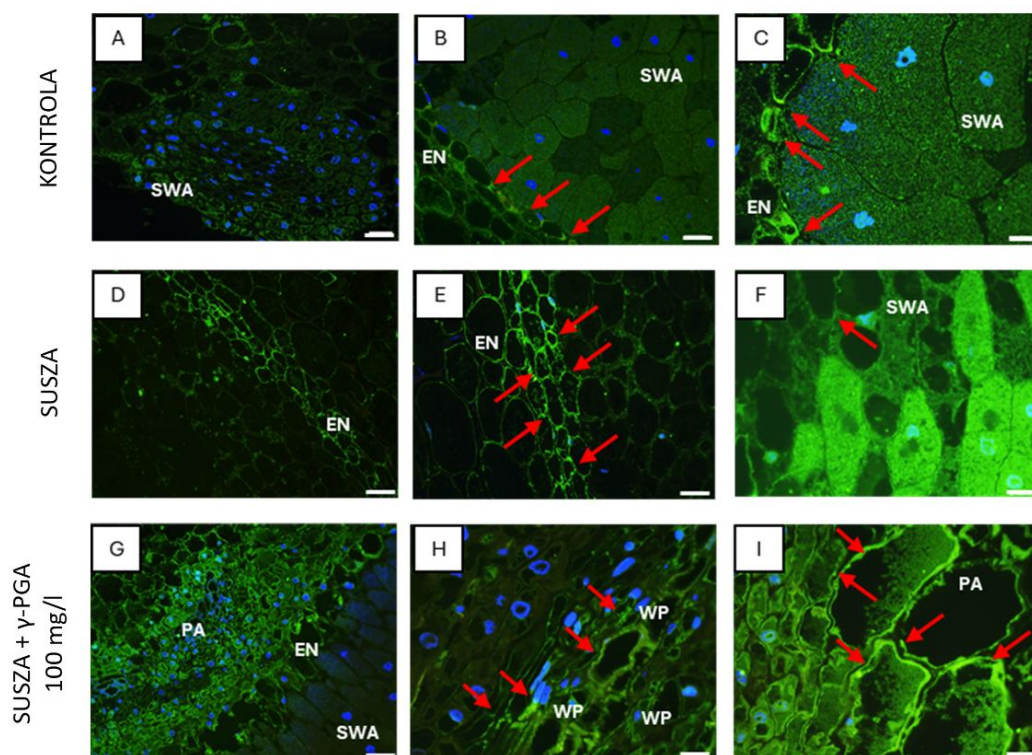


Figura 18. Wpływ roztworu γ -PGA na lokalizację kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC) w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach suszy glebowej. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ -PGA w stężeniu 100 mg/l aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe zbierano w 56 dniu uprawy roślin (5 dni po zakończeniu działania stresora). Czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsca występowania zielonej fluorescencji, wskazującej na obecność ABA. Do wizualizacji jąder użyto DAPI (niebieski sygnał). SWA - strefa wiązania azotu, EN - endoderma, WP - wiązka przewodząca. Bary: 100 μ m w A, D, G; 40 μ m w B, E, H; 20 μ m C, F, I.

W strefie wiązania azotu u roślin kontrolnych prekursor ET lokalizowano w postaci drobnych punktów emitujących fluorescencję, natomiast w endodermie wypełniał on komórki, zwłaszcza w ich przyściennych rejonach (Fig. 18B, C). W brodawkach korzeniowych roślin uprawianych w warunkach suszy glebowej sygnał fluorescencyjny był silniejszy niż w kontroli, zarówno w strefie wiązania azotu, jak i endodermie (Fig. 18D, E, F). Zastosowanie γ -PGA częściowo ograniczyło efekt wywołany przez suszę. W tym wariacie występowanie ACC zaobserwowano głównie w komórkach endodermy, parenchymy, a także tych, przylegających do wiązek przewodzących. W strefie wiązania azotu ACC występował jedynie w pojedynczych komórkach (Fig. 18I).

4.6.3. Kwas jasmonowy

Kontynuacją badań dotyczących fitohormonalnej odpowiedzi *L. luteus* na γ -PGA było określenie lokalizacji JA – głównego przedstawiciela JAs (Fig. 19).

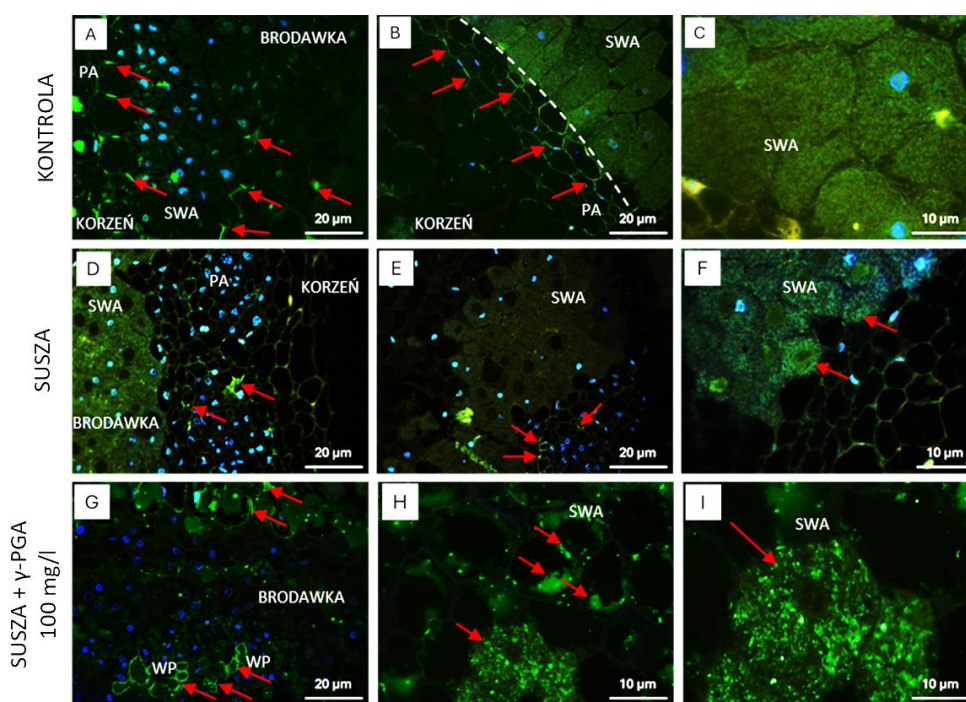


Figura 19. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na lokalizację kwasu jasmonowego (JA) w brodawkach korzeniowych *Lupinus luteus* uprawianego w warunkach suszy glebowej. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ -PGA w stężeniu 100 mg/l aplikowano doglebowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe zbierano w 56 dniu uprawy roślin (5 dni po zakończeniu działania stresora). Do wizualizacji jąder użyto DAPI (niebieski sygnał). Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca występowania sygnału zielonej fluorescencji, wskazujące na obecność JA. Oznaczenia: SWA – strefa wiązania azotu, PA – parenchyma, WP – wiązka przewodząca. Wartości skali podano na poszczególnych zdjęciach.

W warunkach kontrolnych zielony sygnał wskazujący na występowanie tego fitohormonu był obserwowany w postaci skupisk, przede wszystkim w endodermie, która otacza strefę wiązania azotu (Fig. 19A), oraz w komórkach parenchymy (Fig. 19B). W samej strefie wiązania azotu zanotowano słabą, rozproszoną fluorescencję (Fig. 19C). Susza glebowa doprowadziła do pojawienia się JA w parenchymie (Fig. 19D) oraz w strefie wiązania azotu (Fig. 19D, F). Po zastosowaniu γ -PGA sygnał wskazujący na występowanie JA zaobserwowano w wiązkach przewodzących (Fig. 19G) oraz w strefie wiązania azotu, przy czym w tym przypadku hormon lokalizowano punktowo (Fig. 19H, I).

4.7. Wpływ γ -PGA na przemiany lipidowe zachodzące w brodawkach i korzeniach *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie

Zaprezentowany w niniejszej dysertacji podwyższony poziom MDA w brodawkach korzeniowych *L. luteus* po zadziałaniu suszy (Fig. 7) sugeruje, że stresor ten poprzez destabilizację komponentów lipidowych zaburzył integralność błon komórkowych. Zmiany metabolizmu lipidów błonowych mogą być związane z działaniem LOX, która inicjuje peroksydację PUFA, zmniejszając płynność dwuwarstwy lipidowej (Mao i wsp. 2007), co jednocześnie może inicjować biosyntezę JAs (Wasternack i Hause 2013; Wasternack i Strnad 2016). Wyniki wcześniejszych analiz prowadzonych na brodawkach korzeniowych *L. luteus* wykazały, że deficyt wody w glebie promuje ekspresję *LILOX* (Wilmowicz i wsp. 2020). Dlatego w kolejnym etapie realizacji niniejszej pracy zbadano wpływ γ -PGA na poziom aktywności transkrypcyjnej tego genu w brodawkach korzeniowych roślin uprawianych w warunkach suszy glebowej (Fig. 20A). Egzogenny γ -PGA znacznie obniżał ekspresję *LILOX*. Co warto podkreślić, poziom transkryptu tego genu był niższy nie tylko w odniesieniu do suszy, ale także o ponad 96 % niższy niż u roślin uprawianych w optymalnych warunkach (Fig. 20A).

Analiza Western blot wykazała obecność dwóch izoform LOX o masach ~100 kDa i ~98 kDa. W warunkach suszy obserwowano akumulację obu z nich, co potwierdza indukcję białka LOX przez deficyt wody (Fig. 20B).

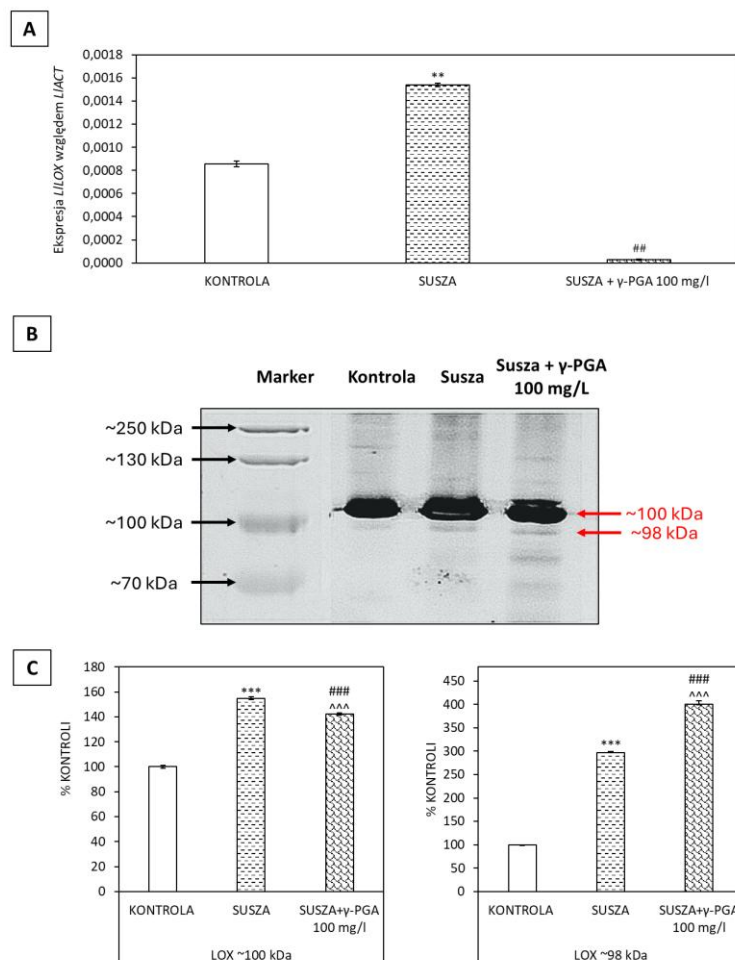


Figura 20. Wpływ kwasu poli-γ-glutaminowego (γ-PGA) na ekspresję genu *LlLOX* w brodawkach korzeniowych (A) oraz poziom lipooksygenazy (LOX) w górnej części korzenia (B, C) *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, ang. *water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ-PGA w stężeniu 100 mg/l aplikowano dogłębowo w 14 dniu trwania suszy. Materiał do badań zbierano w 56 dniu uprawy roślin (5 dni po zakończeniu działania stresora). Analizy densytometryczne prążków uzyskanych w reakcjach Western blot wykonano przy pomocy programu ImageJ (C). Na wykresach przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem $\pm$ SE. Istotne statystycznie różnice określono na podstawie wieloczynnikowej analizy ANOVA oraz testu post hoc Tuckey'a. Różnice istotne statystycznie: dla roślin poddanych suszy względem kontroli ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ-PGA względem suszy ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$; dla roślin uprawianych w warunkach suszy i jednocześnie traktowanych γ-PGA względem kontroli ^^^ $p < 0,001$.

W roślinach traktowanych roztworem γ-PGA w warunkach suszy poziom izoformy o większej masie spadł o ok. 14% w porównaniu do samej suszy. Analiza densytometryczna izoformy ~98 kDa wykazała, że aplikacja γ-PGA w warunkach stresu wzmocniła jej akumulację do ok. 400% kontroli.

Immunolokalizacja FAAH wykazała zróżnicowane jej rozmieszczenie w brodawkach korzeniowych *L. luteus*. U roślin kontrolnych sygnał zaobserwowano głównie w okolicy wiązek przewodzących (Fig. 21A), w komórkach strefy wiązania azotu (Fig. 21C) oraz w pojedynczych komórkach parenchymy (Fig. 21B).

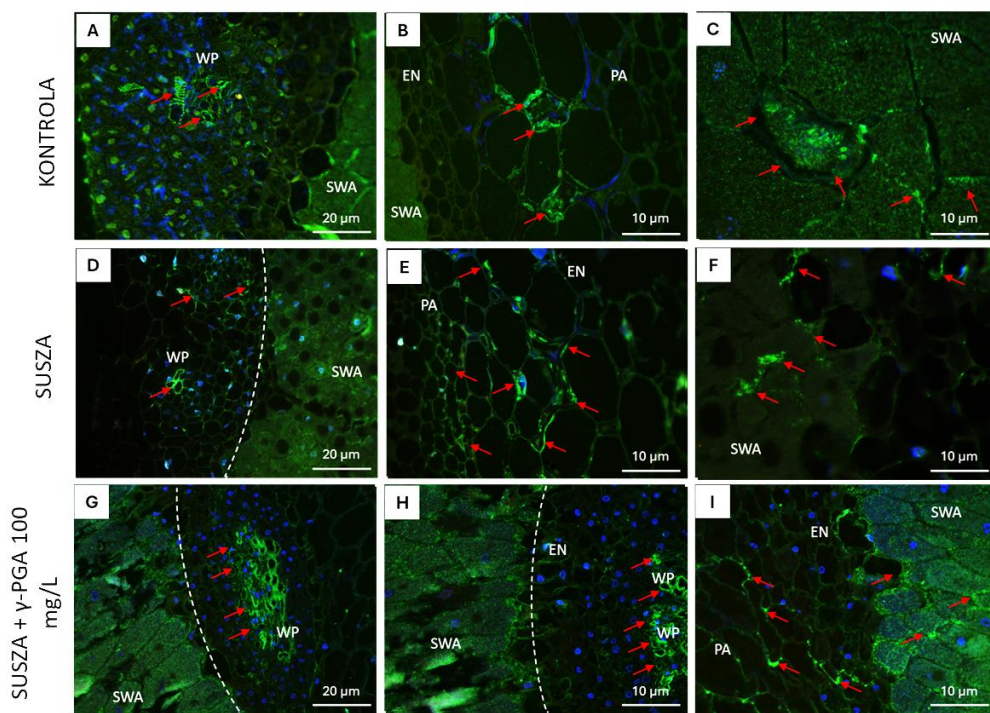


Figura 21. Wpływ kwasu poli- γ -glutaminowego (γ -PGA) na lokalizację hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (FAAH) w brodawkach korzeniowych *L. luteus*. Rośliny poddawane stresowi suszy uprawiano przy 25% pełnej pojemności wodnej gleby (WHC, *ang. water holding capacity*), rośliny kontrolne rosły w glebie o optymalnej pojemności wodnej (70% WHC). Wodny roztwór γ -PGA w stężeniu 100 mg/l aplikowano dogłębowo w 14 dniu trwania suszy. Brodawki korzeniowe zbierano w 56 dniu uprawy roślin (5 dni po zakończeniu działania stresora). Do wizualizacji jąder użyto DAPI (niebieski sygnał). Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca występowania sygnału zielonej fluorescencji, wskazujące na obecność FAAH. Skróty: SWA – strefa wiązania azotu, WP – wiązka przewodząca, PA – parenchyma, EN – endoderma. Wartości skali podano na poszczególnych zdjęciach.

W warunkach stresu suszy fluorescencja wskazująca na występowanie FAAH była nieco słabsza w porównaniu z kontrolą, zlokalizowano ją w pobliżu wiązek przewodzących oraz w endodermie oraz parenchymie (Fig. 21D, E). W strefie wiązania azotu sygnał wystąpił w nielicznych komórkach (Fig. 21F). W przypadku stresowanych roślin traktowanych roztworem γ -PGA zaobserwowano silną fluorescencję FAAH (Fig. 21H, I), szczególnie wyraźną w rejonie wiązek przewodzących, przysięcinnie w komórkach strefy wiązania azotu oraz parenchymy (Fig. 21I).

4.8. Susza i γ -PGA modyfikują profil białek w korzeniu *L. luteus*

W celu scharakteryzowania proteomicznych reakcji korzeni *L. luteus* na suszę i traktowanie γ -PGA przeprowadzono analizę 2-DE białek wyizolowanych z tych organów (Fig. 22). Porównanie proteomicznych map ujawniło wyraźne różnice we wzorcach plamek białkowych dla trzech wariantów doświadczalnych: roślin kontrolnych (Fig. 22A), poddanych suszy glebowej (Fig. 22B) oraz suszy glebowej z traktowaniem γ -PGA (Fig. 22C).

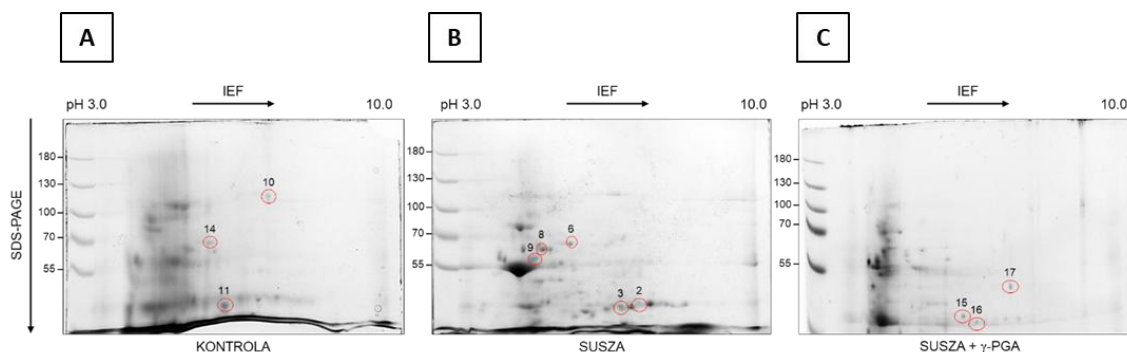


Figura 22. Rozdział elektroforetyczny 2-DE białek z korzeni *Lupinus luteus* w warunkach kontrolnych (A), suszy (B) oraz poddanych działaniu suszy glebowej i γ -PGA (C). Numery i przypisane im okręgi wskazują zróżnicowane plamki białkowe.

Uzyskane wyniki wskazują na jakościowe modyfikacje profilu proteomicznego korzeni *L. luteus*. Poszczególne plamki białkowe zidentyfikowano metodą MALDI-TOF/TOF. W warunkach suszy profil białkowy wyraźnie przesunął się w kierunku odpowiedzi rośliny na ten negatywny czynnik (Fig. 22B, Tabela 12). Zidentyfikowano białka związane z ochroną przed stresem, przy częściowym zachowaniu metabolizmu podstawowego, a wśród nich:

- aldolaza fruktozo-1,6-bisfosofanowa zaangażowana w glikolizę, współwystępująca z oksydazą ACC związaną z biosyntezą stresowego fitohormonu - ET, akwaporyna PIP2-1 transportująca wodę przez błony oraz białka bogate w prolinę;
- opiekuńcze chaperony (organizujące kompleks HSP70-90 i Cpn60/TCP) oraz cytozolowe i mitochondrialne chaperoniny;
- pełniące funkcje sygnałowe kalmodulinę oraz glukan 1,3- β -glukozydazę, które są związane z wywołaną przez stres modyfikacją ściany komórkowej, a także tubulinę α zaangażowaną w przebudowę cytoszkieletu;
- reduktaza leghemoglobiny, która odpowiada za metabolizm azotu.

Z drugiej strony w wariancie suszy nie zaobserwowano plamek białkowych, które występowały w kontroli (Fig. 22A, Tabela 12). W tym przypadku plamki zawierały głównie enzymy glikolizy i dalszych przemian energetycznych w mitochondriach, metabolizmu cukrów i lipidów oraz kilka podstawowych enzymów ochrony antyoksydacyjnej. Wśród nich dominowały:

- te związane z metabolizmem podstawowym węglowodanów (syntaza sacharozy, fosfomutaza, różne izoformy aldolazy fruktozo-bisfosofanowej oraz dehydrogenazy jabłczanowa i aldehydu-3-fosfoglicerynowego) i białek (izomeraza mostków disiarczkowych);
- enzymy oksydoredukcyjne i pośredniczące w metabolizmie RFT (peroksydazy, reduktaza monodehydroaskorbinowa) i/lub modyfikacją struktury ścian komórkowych (lakaza, mutaza UDP-arabinozy) i błon komórkowych (lipooksygenaza, aneksyna).

Zastosowanie γ -PGA u roślin uprawianych w warunkach suszy doprowadziło do dalszych zmian w profilu proteomicznym korzeni (Fig. 22C, Tabela 12). Poza białkami indukowanymi przez suszę, takimi jak: tubuliny czy oksydaza ACC zaobserwowano obecność unikalnych białek związanych z metabolizmem redoks i ochroną komórkową, m.in.:

- syntaza cysteiny kluczowa w syntezie glutationu (antyoksydanta), peroksydazy i oksydoreduktazy wspomagające lignifikację ścian komórkowych i detoksykację H_2O_2 ;
- syntetaza glutaminy istotna w metabolizmie azotu oraz aminotransferaza asparaginianowa związana z modyfikacją metabolizmu i syntezą aminokwasów oraz białek;
- te zaangażowane w szlak biosyntezy flawonoidów (silnych antyoksydantów) – reduktaza izoflawonowa oraz syntaza flawonolu istotna dla powstawania flawonoli;
- glukan endo-1,3- β -glukozydaza uwalniająca glukozę i oligosacharydy ze ścian komórkowych oraz α -1,4-glucan-białko syntaza katalizująca reakcję glikozylacji – oba enzymy związane z powstawaniem substratów do budowy i remodelowania ścian komórkowych.

Dodatkowo, w korzeniach roślin traktowanych γ -PGA zidentyfikowano białko szoku chłodu pochodzenia bakteryjnego (*Rhizobium*), pojawiające się w warunkach

stresowych, którego obecności nie odnotowano w pozostałych wariantach doświadczalnych.

Tabela 12. Białka zidentyfikowane w korzeniach *L. luteus* uprawianych w warunkach kontrolnych, suszy glebowej (25% WHC) oraz przy jednoczesnym zastosowaniu suszy i γ -PGA.

	Nazwa białka	Organizm	Masa [Da]	Score
Spot 10 KONTROLA	Linoleate 9S-lipoxygenase-like	<i>L. angustifolius</i>	153688	1374
	Sucrose synthase	<i>L. albus</i>	96547	126
	Fructose-bisphosphate aldolase 1	<i>L. albus</i>	38421	64
	Putative peroxidase	<i>L. albus</i>	36249	59
	Annexin D1-like	<i>L. angustifolius</i>	35934	59
Spot 11 KONTROLA	Cytosolic malate dehydrogenase	<i>L. angustifolius</i>	35755	558
	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme	<i>L. angustifolius</i>	38557	478
	Putative malate dehydrogenase	<i>L.albus</i>	36232	418
	Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>L.albus</i>	36810	318
	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2	<i>L.albus</i>	38575	313
	Fructose-bisphosphate aldolase 1	<i>L.albus</i>	43406	153
	Putative UDP-arabinopyranose mutase	<i>L.albus</i>	40529	102
	Putative peroxidase	<i>L.albus</i>	36249	101
	Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>L.albus</i>	45607	74
	Monodehydroascorbate reductase	<i>L.albus</i>	47116	54
Spot 14 KONTROLA	Phosphotransferase (phosphomutase)	<i>L.albus</i>	62024	879
	Protein disulfide-isomerase-like	<i>L. angustifolius</i>	57053	244
	Putative peroxidase	<i>L.albus</i>	36249	149
	Fructose-bisphosphate aldolase 1	<i>L.albus</i>	43406	52
	Putative fructose-bisphosphate aldolase	<i>L.albus</i>	38421	50
	Putative laccase	<i>L.albus</i>	61320	38
Spot 2 (SUSZA)	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme	<i>L. angustifolius</i>	38 557	1235
	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2	<i>L.albus</i>	38 575	1182
	Fructose-bisphosphate aldolase 6, cytosolic	<i>L. angustifolius</i>	38 892	504
	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4-like	<i>L. angustifolius</i>	40 064	120
	36.4 kDa proline-rich protein-like	<i>L. angustifolius</i>	16 771	37
Spot 3 SUSZA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme	<i>L. angustifolius</i>	38 557	394
	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4-like	<i>L. angustifolius</i>	40 064	39
	Aquaporin PIP2-1-like	<i>L. angustifolius</i>	30 892	37
Spot 6 SUSZA	Late embryogenesis abundant protein (LEA)	<i>L.albus</i>	56 241	104

	Hsp70-Hsp90 organizing protein 1	<i>L.angustifolius</i>	65 349	66
	Chaperonin Cpn60/TCP-1	<i>L.albus</i>	61 004	46
	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial	<i>L. angustifolius</i>	61 906	46
	Glucan 1,3-beta-glucosidase	<i>L.albus</i>	66 453	45
Spot 8 SUSZA	Chaperonin Cpn60/TCP-1 family	<i>L.albus</i>	63 880	135
	36.4 kDa proline-rich protein-like	<i>L. angustifolius</i>	16 771	39
	Calmodulin-2	<i>L.albus</i>	14 664	37
Spot 9 SUSZA	Leghemoglobin reductase	<i>L.albus</i>	53 451	207
	Tubulin	<i>L.albus</i>	50 153	93
	Tubulin alpha-3 chain	<i>L. angustifolius</i>	50 139	93
	36.4 kDa proline-rich protein-like	<i>L. angustifolius</i>	16 771	37
Spot 15 SUSZA + γ -PGA	Cysteine synthase	<i>L.albus</i>	41 987	2636
	Oxidoreductase	<i>L.albus</i>	38 488	1120
	Alpha-1,4-glucan-protein synthase 2	<i>L. angustifolius</i>	41 616	560
	Alpha-1,4-glucan-protein synthase	<i>L.albus</i>	41 579	544
	Peroxidase	<i>L.albus</i>	35 681	499
	Peroxidase 17-like	<i>L. angustifolius</i>	37 657	331
	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	<i>L.luteus</i>	36 288	153
	Tubulin	<i>L.albus</i>	50 281	90
	Glutamine synthetase	<i>L.albus</i>	43 346	77
	Aspartate aminotransferase P1	<i>L. angustifolius</i>	45 941	58
	Flavonol synthase	<i>L.albus</i>	38 412	52
	Extensin peroxidase	<i>L.albus</i>	38 750	48
Spot 16 SUSZA + γ -PGA	Isoflavone reductase-like protein	<i>L. angustifolius</i>	34 278	16595
	Cysteine synthase	<i>L.albus</i>	34 232	717
	Oxidoreductase	<i>L.albus</i>	35 134	701
	Cysteine synthase	<i>L. angustifolius</i>	34 406	638
	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	<i>L.albus</i>	40 717	213
	Peroxidase 17-like	<i>L. angustifolius</i>	37 657	208
	Oxidoreductase	<i>L.albus</i>	35 262	152
	Aspartate aminotransferase P1	<i>L. angustifolius</i>	45 941	111
	MULTISPECIES: cold-shock protein	<i>Rhizobiaceae</i>	7 466	46
Spot 17 SUSZA + γ -PGA	Extensin peroxidase	<i>L.albus</i>	38 750	1674
	Peroxidase 15-like	<i>L. angustifolius</i>	39 366	192
	Tubulin	<i>L.albus</i>	50 326	133
	Tubulin alpha chain	<i>L. angustifolius</i>	50 228	133
	Putative peroxidase	<i>L.albus</i>	36 249	69
	Aspartate aminotransferase P1	<i>L. angustifolius</i>	45 941	36

5. DYSKUSJA

Pomimo wysokiej wartości gospodarczej *L. luteus*, jego uprawa w Polsce ma wciąż niszowy charakter, głównie ze względu na wysoką wrażliwość na deficyt wody w glebie, indukujący masowe i przedwczesne odrzucanie kwiatów, co w konsekwencji drastycznie obniża współczynnik plonowania. Choć mechanizmy leżące u podstaw separacji kwiatów *L. luteus* w warunkach suszy zostały w ostatnich latach dobrze scharakteryzowane (Wilmowicz i wsp. 2018, 2019, 2022; Kućko i wsp. 2019b, 2020), wciąż niewiele wiadomo o procesach zachodzących w systemie korzeniowym, który odgrywa kluczową rolę w percepcji deficytu wody w glebie. Korzeń doświadcza negatywnych skutków stresora, inicjując kaskadę zmian fizjologicznych, metabolicznych oraz molekularnych, które następnie uruchamiają systemiczną odpowiedź rośliny na stres (Gowing i wsp. 1990; Sharp i wsp. 2004; Brunner i wsp. 2015). Zaburzenia w funkcjonowaniu korzeni przekładają się na kondycję całej rośliny, zwłaszcza w fazie rozwoju generatywnego, gdy zwiększa się zapotrzebowanie na wodę i asymilaty. W tym kontekście zastosowanie γ -PGA, polimeru naturalnie produkowanego przez mikroorganizmy, znanego z potencjału biostymulującego i zdolności do poprawy retencji wody w ryzosferze, może stanowić element strategii łagodzenia skutków suszy glebowej u roślin. Wyniki wcześniejszych badań prowadzonych na *B. napus*, *Z. mays*, *T. aestivum*, *C. sativus* i *B. rapa* dowiodły, że γ -PGA zwiększa tolerancję roślin na nasilane przez zmiany klimatyczne stresy abiotyczne (Wang i wsp. 2008; Xu i wsp. 2013; Xu i wsp. 2014; Xu i wsp. 2017), jednak wpływ tego polimeru na *L. luteus* nie był dotąd analizowany. Dlatego celem niniejszej dysertacji doktorskiej było zbadanie, czy egzogeny γ -PGA łagodzi negatywne skutki suszy glebowej w korzeniach *L. luteus*. Z uwagi na fakt, że są to pierwsze tego typu badania prowadzone na łubinie, zastosowano syntetyczny γ -PGA, eliminując interferencję mikrobiologiczną dla precyzyjnej oceny odpowiedzi fizjologicznej roślin.

Optymalizacja dawki i czasu aplikacji γ -PGA w łagodzeniu stresu suszy u *L. luteus*

Pierwszy etap badań miał na celu ocenę zdolności γ -PGA do modulowania odpowiedzi fizjologicznej *L. luteus* na deficyt wody w glebie oraz opracowanie optymalnego schematu aplikacji wspomagającego adaptację roślin do suszy. Wyniki wcześniejszych badań prowadzonych na tym gatunku wykazały, że susza glebowa wpływa zarówno na części nadziemne, jak i podziemne, ograniczając wzrost korzenia

głównego, redukując tempo nodulacji i powodując degradację brodawek korzeniowych. Towarzyszy temu zmniejszenie wydajności wiązania azotu atmosferycznego, utrata turgoru, akumulacja proliny, spadek wskaźnika RWC, zahamowanie wzrostu pędu, zmniejszenie liczby wytworzonych liści, które charakteryzują się niską wartością współczynnika F_v/F_m ; wywołana suszą aktywacja strefy odcinania kwiatów prowadzi do ich przedwczesnej i nadmiernej separacji (Wilmowicz i wsp. 2019, 2020, 2022; Florkiewicz i wsp. 2020; Kućko i wsp. 2022, 2023; Burchardt i wsp. 2024). Ponadto susza moduluje aktywność transkrypcyjną genów *LIBOP*, *LIACS*, *LIACO*, *LIZEP*, *LILOX* i *LILbl* i wzmacnia stan stresu oksydacyjnego, wskutek czego degradowane są lipidowe składniki błon komórkowych i zaburzona jest homeostaza hormonów takich jak ET, ABA i JAs (Wilmowicz i wsp. 2018, 2019; Kućko i wsp. 2022, 2023; Burchardt i wsp. 2024). Kontynuacją tych ustaleń jest prezentowana analiza oddziaływania γ -PGA i suszy glebowej na powyższe parametry, ze szczególnym uwzględnieniem procesów zachodzących w podziemnej części rośliny.

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że długość pędu zredukowana przez suszę niemal o 60% została znacząco, choć nie w pełni, zrekompensowana przez γ -PGA aplikowany bezpośrednio przed zawiązaniem kwiatostanów (14 dzień suszy) (Fig. 1), co potwierdza skuteczność polimeru. Działanie to może wynikać ze stymulacji procesów regeneracyjnych komórek i/lub zwiększenia turgoru w krytycznej fazie rozwoju rośliny (Xu i wsp. 2014, Lei i wsp. 2015; Zhang i wsp. 2017). Fakt, że w tym wariancie eksperymentalnym długość pędów pozostawała nadal o ponad 35% niższa niż w optymalnych warunkach (Fig. 1), świadczy jedynie o częściowym złagodzeniu skutków suszy przez γ -PGA. Niezależnie od terminu aplikacji, roztwór polimeru w stężeniu 70 mg/l był skuteczniejszy niż 100 mg/l, co może wynikać z uniknięcia efektu inhibicyjnego wysokich dawek. Takie hamujące działanie odnotowano wcześniej dla chitozanu (Lopez-Moya i wsp. 2017; Asgari-Targhi i wsp. 2018; Xu i Mou 2018; Acemi i wsp. 2021; Koodamvetty i wsp. 2024), substancji próchnicznych, w tym kwasów huminowych (Steinberg i wsp. 2006; Khaled i Fawy 2011; Daur i Bakhashwain 2013; Yuan i Dickinson 2024) i fulwowych (Ma i wsp. 2022). Wyniki badań przeprowadzonych na *Allium cepa* z użyciem trzech komercyjnie dostępnych preparatów zawierających biopolimery m.in. alginiany, laminarynę, fukoidany, kwasy humusowe i fragmenty polisacharydów wykazały, że stosowane nawet w zalecanych dawkach wywoływały niekorzystne efekty (Silva i wsp. 2020). Podobnie Yuan i Dickinson (2024), analizując działanie komercyjnych biostymulantów w analogicznym

układzie doświadczalnym, stwierdzili toksyczność zbyt wysokich dawek, a dodatkowo wykazali, że zakres stężeń wywierających optymalny efekt u roślin jest bardzo wąski. U *B. napus* oraz *B. rapa* L. subsp. *pekinensis* γ -PGA wykazuje potencjał biostymulujący w stężeniach od 20 do 100 mg/l, łagodząc skutki suszy (Lei i wsp. 2015; Xu i wsp. 2017; Xu i wsp. 2020; Quan i wsp. 2022; Ma i wsp. 2025). W przypadku *B. napus* zastosowanie 20 mg/l γ -PGA powodowało wzrost świeżej masy pędów (Xu i wsp. 2020), podczas gdy u *Z. mays* aplikacja γ -PGA w stężeniach 70 lub 100 mg/l nie przyniosła pożądanego efektu, a najskuteczniejsze okazało się stężenie 50 mg/l (Ma i wsp. 2024). Reasumując, reakcja roślin na suplementację γ -PGA zależy nie tylko od dawki, lecz także od specyfiki gatunkowej.

Susza glebowa generuje stres osmotyczny, który utrudnia pobieranie wody przez korzenie, prowadząc do odwodnienia tkanek i przyspieszonej degradacji chlorofilu w liściach oraz obniżenia intensywności fotosyntezy (Liu i wsp. 2025). Jednym z najczęściej analizowanych nieinwazyjnych wskaźników integralności aparatu fotosyntetycznego jest F_v/F_m , odzwierciedlający stopień fotoinhibicji centrów reakcji tego fotoukładu II. U *L. luteus* fotoprotekcja oceniana na podstawie wartości F_v/F_m była skuteczniejsza przy aplikacji γ -PGA w 7 niż w 14 dniu suszy (Fig. 1), co wskazuje, że ochrona wrażliwego aparatu fotosyntetycznego i ograniczenie uszkodzeń fotochemicznych wymagają wczesnej interwencji i wskazuje, że polimer działa w początkowej fazie stresu. Pozytywny wpływ γ -PGA na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego w warunkach stresów abiotycznych obserwowano także u *T. aestivum*, *B. napus*, *B. rapa* i *Salvia miltiorrhiza* (Quan i wsp. 2022; Shan i Zhang 2024; Zhu i wsp. 2024). U *T. aestivum* poddanego stresowi zasolenia biopolimer ograniczał spadek wartości F_v/F_m , wskazując stabilizację transportu elektronów (Zhu i wsp. 2024). Analogiczne efekty odnotowano w warunkach deficytu wody u *S. miltiorrhiza* (Shan i Zhang 2024). Wpływ γ -PGA manifestowany jest także poprawą parametrów fluorescencji chlorofilu związanych z dystrybucją energii wzbudzenia w PSII. Traktowanie γ -PGA w połączeniu z kwasem glutaminowym zwiększa fotochemiczne wygaszanie oraz ogranicza nefotochemiczne rozpraszanie ciepła u *B. rapa*, co świadczy o efektywnym wykorzystaniu energii świetlnej w łańcuchu fotosyntetycznym (Quan i wsp. 2022). Zbliżone wyniki uzyskano u *T. aestivum* w warunkach stresu solnego, kiedy γ -PGA powodował spadek nefotochemicznego wygaszania, nasilając aktywność fotochemiczną PSII (Zhu i wsp. 2024). Wyniki te sugerują, że polimer usprawnia

zachodzenie reakcji fotochemicznych poprzez ograniczenie strat energii w postaci ciepła i stabilizację gradientu protonowego.

Związanym z fotosyntezą efektem działania γ -PGA jest również utrzymanie wyższej zawartości barwników fotosyntetycznych w warunkach stresu, np. całkowitego chlorofilu u *Z. mays* podczas suszy (Ma i wsp. 2025). U roślin poddanych działaniu kadmu γ -PGA zwiększał zawartość chlorofilu, czemu towarzyszyło zmniejszenie peroksydacji lipidów w błonach chloroplastowych (Wu i wsp. 2024). W literaturze naukowej podkreśla się także wpływ γ -PGA na fizjologię aparatów szparkowych oraz wymianę gazową roślin. Jego zastosowanie u *Z. mays* umożliwiło utrzymanie wyższej przewodności szparkowej oraz intensywności fotosyntezy netto w warunkach deficytu wody (Ma i wsp. 2025). Efekt ten tłumaczono zachowaniem dobrego turgoru komórek, co ogranicza konieczność i opóźnia zamykanie aparatów szparkowych, sprzyjając efektywnej asymilacji CO₂. Reasumując tę część, wzrost parametru Fv/Fm u *L. luteus* potwierdza aplikacyjny potencjał γ -PGA jako efektywnego środka chroniącego aparat fotosyntetyczny roślin narażonych na działanie stresów abiotycznych.

Odpowiedź rośliny na stres suszy obejmuje modyfikacje cech morfologicznych, w szczególności architektury systemu korzeniowego. W prezentowanych badaniach brak istotnego wpływu deficytu wody w glebie na długość korzenia *L. luteus* (Fig. 2) może sugerować, że w momencie zadziałania stresora system korzeniowy osiągnął już maksymalny rozmiar w tej fazie rozwojowej rośliny. Podobne zjawisko obserwowano m.in. u *Arundo donax*, *Casuarina cunninghamiana*, *Pinus radiata*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus sideroxylon* (Sun i wsp. 2024). Choć susza generalnie redukuje u roślin długość korzeni, to u strączkowych, np. *T. repens*, *Vicia cracca*, *Medicago lupulina*, zmiany są zazwyczaj nieistotne statystycznie (Sun i wsp. 2024). Podobne rezultaty uzyskano u *Arundo donax*, gdzie mimo braku skrócenia długości korzeni w górnej warstwie gleby objętej deficytem wody, doszło do redukcji biomasy korzeniowej oraz części nadziemnej (Zegada-Lizarazu i Monti 2019). Analogiczne tendencje opisano u drzew (*C. cunninghamiana*, *P. radiata*, *E. tereticornis*, *E. sideroxylon*), gdzie susza redukowała średnicę korzeni i modyfikowała ich skład chemiczny, m.in. zwiększając zawartość azotu (Carrillo i wsp. 2022). W prezentowanej pracy podanie γ -PGA w niższym stężeniu (70 mg/l) w 7 dniu trwania suszy spowodowało niewielki, lecz istotny statystycznie przyrost długości korzenia *L. luteus*, podczas gdy aplikacja w 14 dniu suszy nie przyniosła efektu (Fig. 2). Najsilniejszą stymulację, przewyższającą zarówno suszę, jak i optymalne warunki, uzyskano po zastosowaniu γ -PGA w wyższym stężeniu (100

mg/l) (Fig. 2). Ten rezultat ma kluczowe znaczenie adaptacyjne, gdyż rozwój systemu korzeniowego penetrującego głębsze, zasobniejsze w wodę warstwy gleby, stanowi efektywną strategię przetrwania suszy (Kashiwagi i wsp. 2006; Sofi i wsp. 2021). Można przypuszczać, że γ -PGA u *L. luteus* stabilizuje wilgotność ryzosfery, dzięki czemu roślina utrzymuje aktywność fizjologiczną, w tym fotosyntezę (Fv/Fm, Fig. 1). Podobne efekty uzyskano u *G. max*, *Ipomoea batatas* i *Z. mays*, gdzie γ -PGA dzięki retencji wody oraz mobilizacji składników mineralnych w ryzosferze zwiększał długość i biomasę korzeni (Wang i wsp. 2008; Ma i wsp. 2022). Mechanizm ten wynika z hydrofilowych właściwości γ -PGA, które poprawiają zatrzymywanie wody w glebie i tworzą gradient wilgotności sprzyjający elongacji komórek (Tarui i wsp. 2005; Yin i wsp. 2018; Liang i wsp. 2021). Dodatkowo chelatacja kationów (Ca^{2+} , K^{+} , Fe^{3+}) stymuluje podziały i wydłużanie komórek w warunkach stresu środowiskowego (Bajaj i Lele 2011; Skalski i wsp. 2024; Yang i wsp. 2024).

Obserwowane u *L. luteus* ograniczenie procesu nodulacji pod wpływem suszy glebowej (Fig. 2) jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi, że w tych warunkach *Fabaceae* redukują symbiozę z bakteriami z powodu wysokich kosztów energetycznych (Serraj i wsp. 1999; Guinel i Geil, 2002; Serraj 2003; Glick, 2005; Wilmowicz i wsp. 2020). Niedobór wody w glebie, obniżając aktywność fotosyntetyczną, ogranicza transport asymilatów do korzeni i tym samym tworzenie oraz funkcjonowanie brodawek. Podobny negatywny wpływ suszy na nodulację odnotowano u *G. max* (Cerezini i wsp. 2016; Dayoub i wsp. 2022), *M. sativa* (Mouradi i wsp. 2016), *C. arietinum* (Koutroubas i wsp. 2023), *V. sativa* i *P. sativum* (Álvarez-Aragón i wsp. 2023). W prezentowanej pracy γ -PGA aplikowany w połowie suszy nie zmienił liczby brodawek korzeniowych *L. luteus*, ale podany później znacząco ją zwiększył, zbliżając do kontroli (Fig. 2). Wynik ten sugeruje, że polimer działa optymalnie w momencie, gdy roślina i bakterie symbiotyczne są już silnie zestresowane, lecz wciąż przed krytyczną fazą nieodwracalnych zaburzeń symbiotycznych i degeneracji symbiosomów. Konfrontując to z wartościami parametru Fv/Fm i elongacją pędu (Fig. 1), można przypuszczać, że w początkowej fazie deficytu wody roślina ogranicza procesy wymagające wysokich nakładów energii, w tym symbiozę (Fig. 2), koncentrując zasoby na utrzymaniu metabolizmu podstawowego, m.in. aktywności fotosyntetycznej, a co za tym idzie, większej produkcji asymilatów, które redystrybuowane do systemu korzeniowego umożliwiają późniejszą reaktywację procesów symbiotycznych. W literaturze podkreśla się, że inicjacja brodawek korzeniowych regulowana jest przez dostępność węgla oraz

przepływ metabolitów pomiędzy częścią nadziemną a systemem korzeniowym (Serraj 2003; Guinel i Geil 2002). W tym kontekście wzrost liczby brodawek korzeniowych obserwowany po późniejszej aplikacji γ -PGA (Fig. 2) może być efektem poprawy bilansu energetycznego rośliny i wskazuje, że dopiero w późniejszym etapie stresu, gdy dzięki działaniu polimeru następuje częściowa stabilizacja procesów fizjologicznych, możliwe jest ponowne uruchomienie nodulacji. Brak doniesień dotyczących badania bezpośredniego wpływu γ -PGA na liczbę brodawek korzeniowych wytwarzanych przez rośliny. Istnieją jednak pośrednie dowody wskazujące na korzyści płynące z aplikacji tego związku na poprawę innych parametrów związanych z budową systemu korzeniowego oraz jego funkcjonowaniem w kontekście symbiotycznych oddziaływań z bakteriami. U *G. max* biopolimer promował wzrost systemu korzeniowego, wykorzystanie wody oraz efektywność wiązania azotu (Jing i wsp. 2023, 2024).

Deficyt wody w glebie zakłócił gospodarkę wodną korzeni *L. luteus*, powodując ok. 10% spadek RWC w porównaniu z kontrolą (Fig. 3), co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na wrażliwość tego gatunku na odwodnienie (Wilmowicz i wsp. 2020). U *Fabaceae* taki spadek RWC to kluczowy wskaźnik fizjologiczny stresu suszy i jedna z głównych przyczyn hamowania wiązania azotu atmosferycznego, wynikająca z podatności nitrogenazy na dehydratację (Gonzalez i wsp. 1998; Serraj 2003). Egzogenny γ -PGA chronił *L. luteus* przed suszą, jednak jego efektywność zależała od dawki i terminu aplikacji. Najsilniejszą stabilizację RWC uzyskano przy niższym stężeniu polimeru (70 mg/l), który aplikowano w połowie okresu suszy (Fig. 3), podczas gdy wyższe stężenie (100 mg/l) zastosowane pod koniec stresu działało niekorzystnie (Fig. 3). Biorąc pod uwagę zdolności γ -PGA do absorpcji wody, można przypuszczać, że negatywny efekt wywołany jest nadmiernym wzrostem osmotycznego potencjału ryzosfery, potęgowanym przez higroskopijność polimeru i ograniczenie dostępnej wody w warunkach suszy. Uzyskane wyniki wskazują, że optymalny termin aplikacji γ -PGA dla stabilizacji gospodarki wodnej korzeni *L. luteus* przypada na wczesną fazę stresu suszy. Natomiast stymulacja inicjacji brodawek korzeniowych była najskuteczniejsza przy późniejszym podaniu polimeru. Różnica ta odzwierciedla odmienne wymagania procesów: szybka ochrona osmotyczna tkanek korzeniowych wymaga wczesnej interwencji, podczas gdy formowanie brodawek, zależne od kondycji rośliny, jak i bakterii symbiotycznych, osiąga maksimum w późniejszej fazie stresu, jednak wciąż przed załamaniem metabolicznym symbiozy.

Efektywna regulacja osmotyczna w tkankach roślin stanowi jeden z fundamentalnych mechanizmów adaptacji do suszy. Stres osmotyczny stymuluje biosyntezę proliny (Szabados i Savouré 2010). W przeprowadzonych badaniach susza spowodowała istotny wzrost stężenia tego aminokwasu w korzeniach *L. luteus* (Fig. 3). Podobną zależność obserwowano, m.in. u *Z. mays* (Ma i wsp. 2022), *Coronilla*, *C. arietinum* (Mafakheri i wsp. 2010), *V. faba* (Siddiqui i wsp. 2015), *Lens culinaris* (Muscolo i wsp. 2015), *P. sativum* (Alexieva i wsp. 2001), *M. sativa* (Erice i wsp. 2007) oraz *B. napus* (Xu i wsp. 2020). Zmiany poziomu proliny u *L. luteus* po aplikacji γ -PGA należy interpretować w kontekście jej podwójnej funkcji w odpowiedzi roślin na stres. Z jednej strony chroni ona organella, z drugiej nadmierna jej akumulacja świadczy o poważnych zaburzeniach homeostazy komórkowej (Szabados i Savouré 2010). Zatem obniżenie zawartości proliny po aplikacji γ -PGA (Fig. 3) nie musi oznaczać osłabienia mechanizmów obronnych rośliny, lecz może wskazywać na skuteczne ograniczenie intensywności stresu osmotycznego dzięki stabilizacji gospodarki wodnej. Spadek poziomu proliny w stosunku do suszy we wszystkich badanych wariantach sugeruje, że zastosowanie γ -PGA łagodziło negatywne skutki stresu pierwotnego. Jednocześnie należy podkreślić, że bardziej efektywne okazało się traktowanie roślin w 14 dniu działania stresora, niezależnie od stężenia roztworu. Zestawienie tych wyników z pomiarami długości pędu i korzenia, parametru F_v/F_m oraz liczby wytworzonych brodawek korzeniowych może potwierdzać stabilizację homeostazy komórek korzenia po okresie adaptacji do stresu przy wsparciu γ -PGA. Podobne zjawisko obserwowano dla innych biostymulatorów poprawiających retencję wody w tkankach roślinnych oraz aktywność antyoksydacyjną, co ograniczało kompensacyjną akumulację proliny (Rouphael i Colla 2020; Ertani i wsp. 2021). Jednak wpływ γ -PGA na poziom proliny zależy zarówno od gatunku, jak i rodzaju działającego stresora. Biopolimer zwiększał jej poziom w siewkach *C. sativus* w sposób zależny od dawki (Pang i wsp. 2018), a u *B. napus* indukował syntezę proliny nawet bez stresu, co wzmacniane było zasoleniem (Xu i wsp. 2017). W przypadku *Z. mays* γ -PGA aktywował kaskadę Ca^{2+}/H_2O_2 , stymulując hormony stresowe (brassinosteroidy, JAs) i sprzyjał akumulacji proliny, poprawiając tolerancję roślin na deficyt wody (Hu i wsp. 2007). Uzyskane wyniki sugerują, że u *L. luteus* γ -PGA działa przede wszystkim jako stabilizator równowagi osmotycznej, ograniczając eskalację stresu i konieczność intensywnej akumulacji proliny.

Na podstawie prezentowanych wyników można wnioskować, że γ -PGA aplikowany we wczesnej fazie suszy stymulował wzrost łubinu, zwiększając długość

pędów i korzeni, poprawiając turgor tkanek i stabilizując aparat fotosyntetyczny. Jednocześnie brak efektu na nodulację w tym okresie odzwierciedla strategiczną oszczędność metaboliczną. W początkowej fazie stresu rośliny koncentrują zasoby przede wszystkim na ochronie gospodarki wodnej i metabolizmu podstawowego, odkładając w czasie kosztowną energetycznie symbiozę. Jej reaktywacja nastąpiła po 14 dniach działania stresora, kiedy aplikacja γ -PGA zwiększyła liczbę brodawek korzeniowych. Wcześniejsza poprawa statusu wodnego, wydajności fotosyntetycznej i obniżenie stresu osmotycznego stworzyły warunki sprzyjające utrzymaniu interakcji symbiotycznych. Wyniki te wskazują, że γ -PGA działa jako stymulator w sposób specyficzny dla fazy rozwojowej łubinu. Szczególnie korzystne efekty obserwowano po zastosowaniu roztworu 100 mg/l γ -PGA w 14 dniu suszy, gdzie notowano wydłużenie korzeni, obniżenie poziomu proliny i jednocześnie usprawnienie nodulacji. Wariant ten wybrano do dalszych badań części podziemnej *L. luteus*, ponieważ umożliwia analizę mechanizmów działania γ -PGA w warunkach, w których związek ten nie tylko wspomaga wzrost, ale realnie przesuwa granice tolerancji rośliny na stres, umożliwiając odtworzenie symbiozy z bakteriami.

Wpływ γ -PGA na gospodarkę redoks *L. luteus* uprawianego w warunkach suszy

Reaktywne formy tlenu jako sygnały promują reakcje obronne, m.in. wzmacnianie ścian komórkowych, produkcję fitoaleksyn czy aktywację enzymów antyoksydacyjnych (Kärkönen i Kuchitsu 2015; Gong i wsp. 2022). Jedną z RFT powstających w warunkach suszy jest H_2O_2 (Hasanuzzaman i wsp. 2020; Dumanović i wsp. 2021), stabilny, dyfundujący przez błony komórkowe związek (Hossain i wsp. 2015; Saxena i wsp. 2016). W korzeniach *L. luteus* deficyt wody ponad pięciokrotnie zwiększył zawartość H_2O_2 (Fig. 6), sygnalizując poważne zaburzenia równowagi redoks, co jest zgodne z wcześniejszymi danymi (Kućko i wsp. 2019; Wilmowicz i wsp. 2019; Burchardt i wsp. 2024). Wyniki analiz NGS prowadzonych u tego gatunku wykazały, że susza glebowa zwiększa w korzeniach aktywność transkrypcyjną genów kodujących homologi oksydaz NADPH (*RBOHB/C/E*) odpowiedzialnych za apoplastyczną produkcję $O_2^{\cdot-}$, który jest przekształcany do H_2O_2 (Burchardt i wsp. 2024). Wzrost zawartości H_2O_2 w warunkach suszy obserwowano także u *Nicotiana tabacum*, *Citrus*, *O. sativa*, *P. sativum* oraz *G. hirsutum* (Hussain i wsp. 2018; Jan i wsp. 2022; Khan i wsp. 2020; Zafar i wsp. 2023; Afzal i wsp. 2025). Aplikacja γ -PGA w 14 dniu suszy istotnie obniżyła poziom H_2O_2 w korzeniach *L. luteus* w porównaniu z roślinami poddanymi wyłącznie działaniu

stresu (Fig. 6). To złagodzenie stresu oksydacyjnego może wynikać zarówno z poprawy gospodarki wodnej rośliny (Fig. 3), jak i modulacji aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w tym APX (Fig. 8). Podobne efekty obserwowano u *B. napus*, gdzie biopolimer wzmacniając działanie enzymów ograniczał akumulację RFT, co skutkowało zmniejszeniem uszkodzeń oksydacyjnych komórek (Xu i wsp. 2020). Z drugiej strony, γ -PGA indukuje przejściowy wzrost H_2O_2 w korzeniach siewek *B. napus*. Biopolimer nie przenika do cytoplazmy komórek korzeniowych, lecz oddziałuje na powierzchni protoplastów poprzez aktywację oksydaz NADPH (Lei i wsp. 2017). Deficyt wody powodował istotny wzrost poziomu markera peroksydacji lipidów (MDA) w korzeniach *L. luteus* (Fig. 7), co może wynikać z nagromadzenia H_2O_2 (Fig. 6) i jego nieskutecznej detoksykacji, wskazując na destabilizację błon komórkowych. W odpowiedzi na stres suszy wzrost zawartości MDA stwierdzono również w szypułkach kwiatów tego gatunku, co wiązało się z aktywnością lipazy i LOX (Wilmowicz i wsp. 2019; Kućko i wsp. 2022). W korzeniach łubinu zaobserwowano wcześniej przesunięcie metabolizmu lipidowego, przekształcanie wolnych kwasów tłuszczowych w triacyloglicerole służące ochronie przed uszkodzeniami wywoływanymi przez RFT w warunkach suszy (Burchardt i wsp. 2024). Akumulację MDA w warunkach deficytu wody odnotowano także u *T. aestivum*, gdzie wiązała się ze spadkiem stabilności błon komórkowych (Abid i wsp. 2018), a u *Salvia officinalis* prowadziła ona do wyraźnego nasilenia stresu oksydacyjnego (Munné-Bosch i wsp. 2001). Obserwacje poczynione podczas realizacji założeń pracy wskazują, że traktowanie γ -PGA jest skutecznym sposobem ograniczenia wtórnych uszkodzeń oksydacyjnych u *L. luteus*. Aplikacja tego polimeru spowodowała niemal 50% redukcję zawartości MDA względem suszy (Fig. 7), co korelowało z obniżeniem zawartości H_2O_2 (Fig. 6) i prawdopodobnie wynikało ze zwiększonej aktywności APX (Fig. 8), potwierdzając funkcjonalny związek między detoksykacją RFT a stabilizacją błon komórkowych. Podobne działanie γ -PGA obserwowano u *B. napus* (Xu i wsp. 2020).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe stanowią substraty dla LOX, inicjujących szlak biosyntezy oksylipin, w tym JAs (Testerink i Munnik 2005; Upchurch 2008). Analiza LOX w górnej części korzenia *L. luteus* wykazała obecność dwóch izoform o masie około 100 kDa oraz około 98 kDa (Fig. 20). Indukowana suszą akumulacja obu z nich (Fig. 20) korelowała ze wzrostem poziomu MDA (Fig. 7), potwierdzając nasiloną peroksydację lipidów i destabilizację błon komórkowych. Udokumentowana już dotychczas korelacja pomiędzy wzrastającym poziomem LOX w korzeniach *L. luteus* a spadkiem ilości kwasu α -linolenowego (18:3) (Burchardt i wsp. 2024) może sugerować

efektywne działanie tego enzymu w warunkach suszy. Zastosowanie γ -PGA obniżało poziom izoformy LOX o wyższej masie, co przy jednoczesnym nagromadzeniu izoformy o masie niższej (Fig. 20) sugeruje, że polimer aktywuje dwa alternatywne szlaki metaboliczne uruchamiane przez LOX w odpowiedzi na stres. Zmiany w poziomie tych białek korelowały z ekspresją genu *LILOX* w brodawkach korzeniowych (Fig. 20), co świadczy o szybkiej aktywacji szlaku biosyntezy oksylipin. Podanie γ -PGA obniżało poziom transkryptu *LILOX* do wartości jeszcze niższej niż w kontroli (Fig. 20). Dane literaturowe wskazują, że większość zidentyfikowanych genów *LOX*, m.in. u *Setaria italica*, *G. hirsutum* i *Raphanus sativus* wykazuje zwiększoną ekspresję w odpowiedzi na stres suszy (Shaban i wsp. 2018; Wang i wsp. 2019a; Zhang i wsp. 2021), jednak są wśród nich takie, które są negatywnie regulowane przez stresor, np. *PmLOX1*, *PmLOX9* i *PmLOX10* u *Panicum miliaceum* (Cong i wsp. 2025). Podobnie wcześniej w korzeniach *L. luteus* w warunkach suszy odnotowano zróżnicowaną ekspresję genów kodujących LOX (*LOXA*, *LOX3*, *LOX4*, *LOXS* i *LOX21*), co odzwierciedla odmienne role w mechanizmach adaptacji do stresu (Burchardt i wsp. 2024). O funkcjonalnym związku *LOX* z obroną przed danym czynnikiem stresowym decyduje różnorodność elementów cis-promotów tych genów (Porta Rocha-Sosa 2002).

Poziom bioaktywnych lipidów pełniących istotną rolę w regulacji wzrostu roślin oraz odpowiedzi na stresy abiotyczne jest regulowany m.in. przez FAAH (Arias-Gaguancela i Chapman 2022). Wyraźny wzrost intensywności sygnału fluorescencyjnego wskazującego na obecność FAAH w brodawkach łubinu w warunkach suszy, szczególnie w endodermie oraz rejonie wiązek przewodzących (Fig. 21), wskazuje na aktywację mechanizmów regulujących poziom bioaktywnych lipidów sygnałowych w tkankach odpowiedzialnych za transport wody oraz sygnałów systemicznych (Arias-Gaguancela i wsp. 2023). Akumulacja FAAH może świadczyć o zwiększonej podaży substratów dla LOX (PUFA). Jak wykazano u *G. hirsutum*, izoformy FAAH (*MtFAAH1*, *MtFAAH2a*) są niezbędne do utrzymania prawidłowej homeostazy rozwojowej, a ich wyciszenie prowadzi do zahamowania wzrostu wywołanego nadmierną akumulacją oksylipinowych pochodnych NAE (Arias-Gaguancela i wsp. 2023). U *A. thaliana* nadekspresja genu *AtFAAH* zwiększa wrażliwość na infekcję bakteryjną wywołaną przez *Pseudomonas syringae*, z kolei mutanty z wyłączonym genem *FAAH* były tak samo odporne jak rośliny typu dzikiego, co sugeruje, że to wzmożona aktywność tego enzymu upośledza mechanizmy obronne (Kang i wsp. 2008). Jednak nagromadzenie FAAH w rejonie wiązek przewodzących, endodermy i strefy wiązania azotu w brodawkach łubinu pod

wpływem γ -PGA w warunkach suszy (Fig. 21) nie wywołuje negatywnych skutków fizjologicznych, co może sugerować inny mechanizm działania tego enzymu podczas interakcji symbiotycznych. Istnieją również przesłanki wskazujące na powiązanie metabolizmu NAE z sygnalizacją hormonalną ABA poprzez czynniki transkrypcyjne z rodziny ABI3 (Teaster i wsp. 2007), co nie jest wykluczone także u łubinu, biorąc pod uwagę podobny wzorec akumulacji FAAH (Fig. 21) i ABA (Fig. 16) w brodawkach pod wpływem suszy i γ -PGA.

Znaczenie wielopoziomowego systemu antyoksydacyjnego w odpowiedzi na suszę potwierdzono w badaniach prowadzonych na korzeniach *L. luteus*, gdzie wywołanej przez stres akumulacji H_2O_2 oraz podwyższonej aktywności enzymów unieczynniających RFT towarzyszy indukcja ekspresji genów kodujących elementy enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego (SOD, CAT, peroksydazy, m.in. GWPX, HEMO-2, PER1, PER9, PER42, PER47, PER51) oraz tych, kodujących homologi oksydaz NADPH (*RBOHB/C/E*) (Wilmowicz i wsp. 2020, 2022; Burchardt i wsp. 2024). Odnotowany podczas suszy wzrost aktywności CAT (Fig. 8) rozkładającej H_2O_2 , stanowi typową reakcję adaptacyjną na zwiększoną produkcję tego związku i został potwierdzony także w liściach *T. aestivum* (Abdel Latef i wsp. 2019; Luna i wsp. 2005) i *O. sativa* (Wang i wsp. 2019b) w warunkach suszy oraz liściach *S. tuberosum* poddanych działaniu egzogennej H_2O_2 (Almeida i wsp. 2005).

W ostatnich latach wykazano, że γ -PGA moduluje odpowiedź antyoksydacyjną roślin. W siewkach *Gossypium* podnosi aktywność SOD i CAT podczas suszy, prowadząc do obniżenia poziomu RFT i MDA (Wang i wsp. 2025b). Działa podobnie w warunkach stresu cieplnego u *B. rapa* subsp. *Pekinensis*, czemu towarzyszy poprawa parametrów fotosyntetycznych (Quan i wsp., 2022). Zastosowanie γ -PGA u *L. luteus* nie przyniosło istotnych statystycznie różnic w aktywności CAT względem roślin poddanych wyłącznie suszy (Fig. 8), co przy równoczesnym obniżeniu poziomu H_2O_2 (Fig. 6) wskazuje na utrzymanie detoksykacji przez ten enzym lub działanie innego systemu unieczynniającego tę RFT. Odmienne wyniki uzyskano u *B. napus*, gdzie γ -PGA zwiększał aktywność CAT w pędach w warunkach suszy (Xu i wsp. 2020), jednak w przytoczonej pracy nie oznaczono poziomu H_2O_2 , zatem niemożliwe jest określenie korelacji pomiędzy jego zawartością a aktywnością CAT. Z drugiej strony, zastosowanie γ -PGA w korzeniach siewek *B. napus* prowadziło do wzrostu zawartości H_2O_2 , którego podwyższony poziom notowano przez kolejne dni, nawet bez akumulacji MDA, co

sugeruje jego pośrednie działanie, związane z sygnalizacją zależną od H_2O_2 (Lei i wsp. 2017).

Wyniki badań uzyskanych w ramach realizowanej pracy wskazują na brak istotnych zmian aktywności APX w korzeniu *L. luteus* w warunkach suszy, jednak γ -PGA doprowadził do wzrostu aktywności tego enzymu (Fig. 8), przy równoczesnym gwałtownym spadku stężenia ASC (Fig. 8). Kwas askorbinowy jest donorem elektronów w reakcji rozkładu H_2O_2 katalizowanej przez APX (Shigeoka i wsp. 2002), a wzrost jej aktywności w stresie interpretuje się jako przejaw efektywnego funkcjonowania cyklu askorbinianowo-glutationowego (AsA-GSH), który umożliwia regenerację antyoksydantów (Abdi i wsp. 2026). Podwyższona względem suszy aktywność APX, połączona ze spadkiem poziomu ASC i H_2O_2 (Fig. 6, 8), podkreśla centralną obronną rolę tego enzymu. Aplikacja γ -PGA w siewkach *Triticum* uprawianych w warunkach stresu kadmowego indukowała wzrost zawartości ASC (Wu i wsp. 2024). Istnieją dowody, że inne od γ -PGA biostymulatory, takie jak ekstrakty z alg morskich czy hydrolizaty białkowe, zwiększają poziom ASC w warunkach suszy, m.in. w liściach *Ocimum basilicum* (Cosentino i wsp. 2023) oraz w liściach i korzeniach *S. lycopersicum*, czemu towarzyszy wzmożona aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POD, CAT i APX) (Wang i wsp. 2022a). Z kolei biostymulatory mikrobiologiczne Bacnifos i Vibacter zwiększają aktywność APX w liściach *S. lycopersicum* oraz *Z. mays* w warunkach suszy, co potwierdza uniwersalny potencjał biostymulatorów w modulacji gospodarki redoks u roślin C3 i C4 (Melo i wsp. 2026). Dane literaturowe dotyczące odpowiedzi APX na stres suszy pozostają niejednoznaczne, podkreślając złożoność tego mechanizmu antyoksydacyjnego. Indukowany przez PEG stres suszy nie zmienia aktywności APX w siewkach *B. napus* (Hasanuzzaman i Fujita 2011), ale jej istotny wzrost notowano w liściach *G. max* w warunkach deficytu wody (Moloi i wsp. 2016). U dwóch odmian *Vigna unguiculata*, jednej odpornej, a drugiej wrażliwej na suszę, aktywność APX w liściach była o 60% wyższa w genotypie tolerancyjnym w warunkach kontrolnych, natomiast pod wpływem suszy zaobserwowano silniejszy wzrost poziomu transkryptów cytozolowych i peroksysomalnych APX w odmianie wrażliwej. Ekspresja chloroplastowych genów APX stymulowana była wcześniej w odmianie odpornej, co sugeruje efektywną detoksykację RFT w miejscu ich produkcji (D'Arcy-Lameta i wsp. 2006). U *A. thaliana* kombinacja suszy i wysokiej temperatury zwiększała ekspresję oraz poziom cytozolowego białka APX1, kluczowego dla aklimatyzacji, a mutanty *apx1* wykazywały wyższą wrażliwość na niekorzystne warunki oraz akumulację H_2O_2 w porównaniu z liniami dzikimi. Brak

tylakoidowej formy APX skutkował słabszym efektem, co podkreśla dominującą, kompensacyjną rolę APX1 (Koussevitzky i wsp. 2008). Opisane powyżej zróżnicowania wskazują na gatunkowo-, genotypowo- i stresowo-specyficzną regulację ekspresji genów *APX* i działania enzymów, które są przez nie kodowane.

Wyniki analiz aktywności GWPX, wykorzystującej H_2O_2 jako substrat do utleniania gwajakolu, dostarczają dodatkowych dowodów na modulujące działanie γ -PGA na układ antyoksydacyjny w korzeniach łubinu. Aplikacja polimeru skutecznie odwróciła stymulujący efekt suszy na aktywność GWPX (Fig. 8), co przy jednoczesnym zachowaniu aktywności CAT i wzroście aktywności APX wskazuje na jej pomocniczą rolę w warunkach silnego stresu oksydacyjnego. Gdy presja RFT słabnie, podstawowe enzymy takie jak CAT i APX wystarczająco neutralizują H_2O_2 , co odzwierciedlają obniżone poziomy MDA i H_2O_2 . Susza zwiększa aktywność APX i GWPX w liściach *F. rubra*, podczas gdy w liściach *L. perenne* parametry te pozostają niezmiennione. Niemniej oba gatunki są w stanie przetrwać stres bez oznak uszkodzeń oksydacyjnych i peroksydacji lipidów (Bandurska i Jóźwiak 2010). U dwóch odmian *O. sativa*, różniących się tolerancją na suszę podczas fazy krzewienia, aktywność SOD rosła wraz z nasileniem i czasem trwania stresu, lecz aktywność POD i CAT była wyższa w odmianie tolerancyjnej (Wang i wsp. 2019a). W korzeniach i pędach *O. sativa* uprawianych w warunkach suszy indukowanej PEG oraz liściach *B. napus* poddanej suszy glebowej aktywność peroksydaz rosła, zwłaszcza w korzeniach roślin tolerancyjnych, choć przy długotrwałym stresie spadała aktywność CAT (Sharma i Dubey 2005; Abedi i Pakniyat 2010). Wzrost aktywności GPWX przy deficycie wody może być cechą odmian tolerancyjnych *G. max* (Moloi i wsp. 2016), z kolei zmniejszenie aktywności tego enzymu obserwowano w siewkach *Z. mays* w odpowiedzi na egzogenne H_2O_2 . Autorzy sugerują, że gdy poziom H_2O_2 spada poniżej progu sygnałowego, obniżana jest aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Mika i wsp. 2010). Taka sytuacja ma miejsce np. wskutek nabywania tolerancji do warunków stresowych (Laxa i wsp. 2019). Może to być związane z uczestnictwem GWPX w lignifikacji i usztywnianiu ścian komórkowych, co stanowi kluczową strategię adaptacyjną (McDougall 1991; López-Serrano i wsp. 2004; Bala i wsp. 2016). Wywołane przez γ -PGA obniżenie aktywności GWPX w korzeniach łubinu wskazuje, że enzym ten nie musi być uruchamiany, gdy stres oksydacyjny jest skutecznie ograniczany.

Aplikacja γ -PGA w warunkach suszy glebowej aktywuje w korzeniach łubinu efektywny mechanizm łagodzenia stresu oksydacyjnego, przejawiający się strategicznym

obniżeniem akumulacji proliny, MDA oraz aktywności GWPX, przy jednoczesnym zachowaniu stabilnej detoksykacji H_2O_2 przez CAT i selektywnym wzmocnieniem aktywności APX. Taki zróżnicowany wzorzec odpowiedzi redoks świadczy o precyzyjnej, energooszczędnej regulacji układu antyoksydacyjnego, unikającej kosztownej, niekontrolowanej indukcji całego systemu, a stawiającej jako priorytet efektywną ochronę metaboliczną oraz strukturalną komórek korzeni.

Wpływ γ -PGA na modyfikacje składu ścian komórkowych w korzeniu *L. luteus* uprawianego w warunkach suszy glebowej

Szczególną rolę w adaptacji roślin do stresu suszy odgrywają pektyny, które poprzez tworzenie uwodnionych struktur żelowych ograniczają uszkodzenia komórek podczas odwodnienia, modulują porowatość apoplastyczną oraz właściwości mechaniczne ściany komórkowej (Leucci i wsp. 2008; Liu i wsp. 2021). Dlatego indukowany suszą wzrost całkowitej zawartości pektyn w korzeniach *L. luteus* (Fig. 10) można interpretować jako element odpowiedzi adaptacyjnej, polegającej na zwiększeniu udziału hydrofilowej macierzy polisacharydowej. Podobnie u *A. thaliana* ich obecność okazała się niezbędna do utrzymania wzrostu korzenia w warunkach niskiego potencjału wody w komórkach (Liu i wsp. 2021). Znaczenie pektyn w odpowiedzi *L. luteus* na stres suszy wykazano także we wcześniejszych badaniach, w których stresor prowadził do ich akumulacji w strefie odcinania kwiatów (Florkiewicz i wsp. 2020). Zwiększony poziom tych polisacharydów podczas deficytu wody obserwowano u *S. lycopersicum* (Roig-Oliver i wsp. 2025) oraz *Gossypium* (Sun i wsp. 2025), a także drzew (Duan i wsp. 2026).

Pomimo licznych badań wskazujących na istotną rolę ściany komórkowej w odpowiedzi na suszę, dane dotyczące wpływu biostymulatorów na przebudowę jej komponentów są ograniczone. Wykazano jednak, że mające zdolność do syntezy γ -PGA bakterie z rodzaju *Bacillus*, skutecznie łagodzą efekty suszy u *Z. mays*, gdzie deficyt wody indukował niemal trzykrotny wzrost zawartości pektyn w liściach (Wilmowicz i wsp. 2022). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy dostarczają dowodów na to, że aplikacja samego γ -PGA w warunkach deficytu wody częściowo odwraca zmiany indukowane stresem, powodując niewielkie obniżenie poziomu pektyn w korzeniach *L. luteus* (Fig. 10). Efekt ten może wynikać z poprawy uwodnienia komórek (Fig. 3), a tym samym ograniczenia potrzeby intensywnej przebudowy ściany komórkowej.

Fracje pektyn o niskim stopniu metylacji łatwo tworzą wapniowe mostki jonowe stabilizujące strukturę ściany, natomiast wysokometylowane charakteryzują się większą elastycznością i zdolnością do wiązania wody (Braybrook i wsp. 2012). Barwienie czerwienią rutenową, selektywnie wiążącą frakcje HG zawierające wolne grupy karboksylowe, ujawniło, że u *L. luteus* γ -PGA powoduje silniejsze niż w suszy nagromadzenie deestryfikowanych pektyn w ścianach komórek korzeni (Fig. 9). Jednak wyniki z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał wykazały, że susza prowadzi do wzrostu zarówno nisko- jak i wysokometylowanych pektyn w brodawkach korzeniowych *L. luteus* (Fig. 11), sugerując tworzenie za ich pośrednictwem hybrydowej macierzy łączącej sztywność ściany komórkowej z jej hydrofilowością. Podobną reorganizację tych składników opisano w liściach rośliny rezurekcyjnej *Craterostigma wilmsii* (Jung i wsp. 2019), co implikuje znaczenie ochronne obu rodzajów pektyn. Frakcja wysokometylowanych pektyn dominuje w nowo powstałych ścianach komórkowych oraz w tkankach intensywnie rozwijających się, natomiast duża ilość grup metylowych zasłania ujemnie naładowane reszty kwasu galakturonowego, zapobiegając oddziaływaniom z Ca^{2+} . Nadaje to ścianie wysoką plastyczność i elastyczność oraz umożliwia swobodne przemieszczanie się mikrowłókien celulozowych podczas wzrostu elongacyjnego (Xiao i wsp. 2014). Można więc wnioskować, że akumulacja wysokometylowanych pektyn u łubinu chroni komórki przed gwałtownym odwodnieniem i pozwala na zachowanie turgoru w warunkach stresu. Natomiast nagromadzenie pektyn o niskim stopniu metylacji, zapobiega zapadaniu ściany przy ujemnym ciśnieniu hydrostatycznym, chroniąc komórki przed dodatkowymi uszkodzeniami mechanicznymi. Brak konieczności uruchamiania mechanizmów adaptacyjnych związanych z akumulacją HG w wariancie po traktowaniu γ -PGA (Fig. 11), może wynikać ze zdolności polimeru do zwiększania stopnia uwodnienia tkanek, a tym samym zachowania odpowiedniej plastyczności ścian komórkowych w warunkach stresu.

Analiza pozostałych komponentów ściany komórkowej potwierdziła nagromadzenie arabinanów, galaktanów, XGA oraz ksyloglukanów w korzeniach łubinu w warunkach suszy (Fig. 12, 13). Arabinany dominują w młodych komórkach, natomiast galaktany występują obficie w starszych (Ermei i wsp. 2000; Szymańska-Chargot i wsp. 2016). Arabinany i galaktany, tworząc boczne łańcuchy RG-I, zwiększają elastyczność ściany komórkowej oraz jej zdolność do odwracalnych deformacji w warunkach stresu suszy (Moore i wsp. 2008; Moneo-Sánchez i wsp. 2020), które polegają na promowaniu

ich mobilności, dzięki czemu mogą one wypełniać wolne przestrzenie utworzone przez przegrupowanie celulozowych mikrofibryli. Mutanty *S. tuberosum* o obniżonej zawartości arabinanów i galaktanów charakteryzowały się niższą elastycznością ścian komórkowych, co sprzyjało ich sztywnieniu i zwiększało podatność na mikrouszkodzenia (Ulvskov i wsp. 2005). Galaktany stabilizują strukturę ściany komórkowej i retencję wody u *S. tuberosum* (Klaassen i Trindade 2019), *A. thaliana*, (Lim i wsp. 2020), *Grahamia bracteata*, *Aloe striata* (Fradera-Soler i wsp. 2022a, 2022b) oraz *Pinus radiata* (Zhang i wsp. 2016).

Arabinany regulują odległości między łańcuchami HG, zapobiegając ich nadmiernym interakcjom z Ca^{2+} , a tym samym zapewniając plastyczność ścian komórek (Harholt i wsp. 2010). Niekonwalencyjne oddziaływania między HG a XGA odgrywają istotną funkcję w regulacji uwodnienia apoplastu i reorganizacji pektynowej sieci matrycowej, modulując porowatość i plastyczność pierwotnej ściany komórkowej (Park i Cosgrove 2015). Wywołane suszą nagromadzenie XGA w korzeniach łubinu (Fig. 12) obserwowano także wcześniej w brodawkach tego gatunku (Wilmowicz i wsp. 2022) oraz *P. sativum* (Mravec i wsp. 2017). Zasugerowano, że XGA w perydermie brodawek pełni rolę pierwotnej bariery ochronnej, stanowiąc istotny komponent odpowiedzi rośliny na stres suszy (Mravec i wsp. 2017). Składniki te, poprzez selektywne wiązanie jonów oraz dzięki hydrofilowym właściwościom, wzmacniają macierz apoplastyczną, ograniczając niekontrolowany wypływ wody w warunkach jej deficytu. Podwyższony poziom ksyloglukanów, obserwowany podczas suszy w korzeniach łubinu (Fig. 13), odnotowano wcześniej w korzeniach siewek *T. aestivum* (Leucci i wsp. 2008). Zgodnie z modelem Cosgrove'a (2005) ksyloglukany tworzą połączenia pomiędzy mikrofibrylami celulozy, generując naprężenia odpowiedzialne za sztywność biomechaniczną, dlatego ich akumulacja świadczy o adaptacji do stresu. Nagromadzenie arabinanów, galaktanów, XGA i ksyloglukanów może być mechanizmem regulującym plastyczność ściany komórkowej, który, modulując naprężenia między mikrofibrylami celulozowymi, minimalizuje ryzyko mechanicznego zapadania się odwodnionych komórek. Traktowanie łubinu γ -PGA aktywnie reprogramuje metabolizm ściany komórkowej związany z obecnością tych komponentów, gdyż w każdym przypadku odwraca efekty wywoływane suszą, co pozwala na zachowanie integralności strukturalnej komórek i przywraca im funkcjonalność zbliżoną do warunków kontrolnych. Wydaje się, że stymulator eliminuje konieczność nadmiernego rozbudowania macierzy hydrofilowej w korzeniach *L. luteus*.

Wpływ γ -PGA na zmiany histologiczne i ultrastrukturalne komórek w brodawkach korzeniowych *L. luteus* uprawianego w warunkach deficytu wody w glebie

W celu określenia wpływu suszy glebowej oraz egzogenego γ -PGA na budowę brodawek korzeniowych *L. luteus* przeprowadzono analizy histologiczne. Stres suszy wywoływał wyraźne zmiany degradacyjne w strukturze brodawek korzeniowych, szczególnie w strefie wiązania azotu, która jest kluczowa dla efektywności symbiozy (Fig. 4). Jednym z najbardziej charakterystycznych objawów była nasilona plazmoliza komórek, obserwowana zwłaszcza w obrębie endodermy (Fig. 4), która wynikała z obniżonego potencjału wody w glebie i spadku turgoru komórek, co jest typową reakcją tkanek roślinnych na stres osmotyczny wywołany odwodnieniem (Farooq i wsp. 2009). Oddzielenie protoplastu od ściany komórkowej może być efektem opisanej wcześniej kumulacji polisacharydowej, hydrofilowej macierzy apoplastycznej (Fig. 4). Uszkodzenia strukturalne endodermy mają istotne konsekwencje funkcjonalne, ponieważ tkanka ta stanowi selektywną barierę regulującą transport wody i jonów pomiędzy symplastem i apoplastem kierując, je do wiązek przewodzących, a dzięki temu umożliwiając roślinie kontrolowanie przepływu wody w warunkach jej niedoboru (Studer i Peterson 1998). W brodawkach *L. luteus* w warunkach suszy obserwowano oznaki destabilizacji strukturalnej endodermy, co wskazuje na podstępującą degradację tkanek. Utrata integralności endodermy przyczynia się do niekontrolowanego przepływu wody w apoplaście, zwiększonego przenikania jonów do ksylemu, a przez to zaburzeń równowagi jonowej w roślinie, co obniża efektywność jej pobierania przez korzeń podczas suszy (Doblas i wsp. 2017). W warunkach obniżonego potencjału wody w glebie rośliny często wzmacniają strukturę endodermy poprzez inkrustację, np. suberyną i ligniną, co ogranicza niekontrolowany wypływ wody i umożliwia utrzymanie turgoru komórek (Liu i wsp. 2022). Występowanie skondensowanej cytoplazmy z ziarnistymi agregatami w komórkach brodawek *L. luteus* w warunkach suszy (Fig. 4) odzwierciedla zmniejszenie objętości symplastu. Zjawisko to obserwowano m.in. u *T. aestivum* (Verbeke i wsp. 2022) i *Z. mays* (Xiao i wsp. 2024) poddanym stresom suszy lub osmotycznym i wiąże się ono z zaburzeniami gospodarki wodnej oraz spadkiem

aktywności metabolicznej komórek. Ziarnistości cytoplazmatyczne mogą być efektem nagromadzenia zdegradowanych organelli lub struktur pojawiających się w wyniku stresu oksydacyjnego i autofagii (Chang i wsp. 2022), która jest procesem inicjowanym w warunkach silnego stresu abiotycznego umożliwiającym usuwanie uszkodzonych organelli (Avin-Wittenberg 2019). Podobne agregaty cytoplazmatyczne obserwowano w brodawkach korzeniowych innych roślin strączkowych poddanych działaniu suszy, m.in. *G. max*, gdzie wiązano je z procesami starzenia brodawek oraz degradacją symbiosomów (Ladrera i wsp. 2007).

W komórkach brodawek łubinu narażonych na stres suszy obserwowano pogrubienie ścian komórkowych (Fig. 4), wynikające najprawdopodobniej z przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej (Saja-Garbarz i wsp. 2024) oraz opisywanego wcześniej odkładania komponentów polisacharydowych w apoplasmie (Fig. 4). Zastosowanie egzogenego γ -PGA w warunkach suszy wyraźnie ograniczało zakres zmian degradacyjnych (Fig. 4), normalizując grubość ścian. Brodawki korzeniowe roślin traktowanych polimerem zachowywały strukturę histologiczną zbliżoną do wariantu kontrolnego (Fig. 4), z wyraźnym przyleganiem protoplastów do ścian komórkowych, świadczącym o utrzymaniu turgoru oraz eliminacji plazmolizy (Lang i wsp. 2014). Ponadto w komórkach tych nie obserwowano tak licznych ziarnistości cytoplazmatycznych (Fig. 4) jak w wariancie stresowym, co sugeruje, że polimer może ograniczać uszkodzenia i modyfikacje struktury komórek wywołane odwodnieniem.

Analiza ultrastrukturalna TEM umożliwiła doprecyzowanie subkomórkowych zmian wywołanych suszą i traktowaniem γ -PGA w strefie wiązania azotu brodawek *L. luteus* (Fig. 5). Deformacja błon mitochondriów w warunkach stresu sygnalizuje zaburzenie metabolizmu energetycznego i ograniczenie produkcji ATP. Analogiczne zmiany dokumentowano u *A. thaliana*, *T. aestivum* i *T. durum* (Ostaszewska i wsp. 2014; Tang i Zhu 2023). Modyfikacje te mają szczególnie negatywne konsekwencje dla działania nitrogenazy, która wymaga znacznych nakładów ATP, co sprawia, że prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest kluczowe dla utrzymania aktywności symbiotycznej (Silsbury 1977; Haskett i wsp. 2022). W związku z tym obserwowane u *L. luteus* zmniejszenie liczby bakteroidów oraz symbiosomów w strefie wiązania azotu (Fig. 5) wskazuje na degradację aparatu symbiotycznego, co koreluje z obniżeniem wydajności wiązania azotu w warunkach suszy (Wilmowicz i wsp. 2020). Zbliżone efekty obserwowano u *G. max* poddanej stresowi suszy (Ladrera i wsp. 2007), a także w tkankach *V. sativa* i *P. sativum* eksponowanych na stres osmotyczny (Álvarez-Aragón i

wsp. 2023). Podobne jak u *L. luteus* deformacje jąder komórkowych (Fig. 5) występowały w odpowiedzi na deficyt wody u *Brachypodium distachyon* w warunkach stresu osmotycznego (Chen i wsp. 2018). Badania na *A. thaliana* wykazały, że stres osmotyczny zmniejsza rozmiar i deformuje kształt jąder komórkowych (Goswami i wsp. 2020). W warunkach suszy akumulowane są RFT, które bezpośrednio uszkadzają DNA, białka oraz strukturę otoczki jądrowej, co zaburza integralność jądra, powodując deformacje lub fragmentacje (Hura i wsp. 2022).

Zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych i liza blaszek środkowych w brodawkach łubinu (Fig. 5) świadczą o postępującej utracie integralności tkankowej wywołanej suszą. Degradacja blaszek środkowych bogatych w demetylowane HG jest wywołana aktywacją enzymów hydrolitycznych, takich jak pektynazy, poligalakturonazy czy celulazy, które rozkładają pektyny odpowiedzialne za adhezję komórek, osłabiając połączenia międzykomórkowe i zwiększając wolne przestrzenie, co wcześniej obserwowano w tkankach roślin poddanych stresom abiotycznym (Leucci i wsp. 2008). Transport enzymów remodelujących ścianę komórkową zachodzi drogą sekrecji pęcherzykowej do apoplastu, poprzez aparat Golgiego oraz sieć trans-Golgi (de la Canal i Pinedo 2018). Taki scenariusz jest prawdopodobny w brodawkach *L. luteus*, gdzie obecność licznych pęcherzyków w cytoplazmie komórek (Fig. 6) sugeruje zwiększoną aktywność szlaków sekrecyjnych odpowiedzialnych za transport enzymów modyfikujących ściany w warunkach stresu. Zastosowanie γ -PGA u łubinu podczas suszy skutkowało zachowaniem ultrastruktury brodawek zbliżonej do kontroli, czego przejawem była jednorodna cytoplazma pozbawiona ziarnistości oraz cienkie ściany komórkowe (Fig. 6), co może oznaczać, że polimer poprzez wpływ na właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulację gospodarki wodnej w warunkach suszy ogranicza przebudowę ściany (Wu i Cosgrove 2000; Roig-Oliver i wsp. 2021; Duan i wsp. 2026). Najistotniejszym efektem działania γ -PGA, decydującym o jego wartości aplikacyjnej w biostymulacji symbiotycznej, było zachowanie prawidłowej struktury symbiosomów i integralności bakteroidów, co implikuje kontynuację cyklu wiązania azotu. Zachowanie homeostazy strukturalnej po traktowaniu roślin polimerem świadczy o strategicznym przesunięciu metabolicznym z kosztownej przebudowy ściany komórkowej i nadprodukcji jej komponentów ku regeneracji symbiozy.

Wpływ γ -PGA na czynniki regulujące powstawanie i funkcjonowanie brodawek korzeniowych

Wyniki analiz molekularnych wskazują, że geny kodujące czynniki transkrypcyjne z rodziny BOP kontrolując zarówno podziały komórkowe, jak i różnicowanie tkanek (Khan i wsp. 2012; Wu i wsp. 2012; Frankowski i wsp. 2015; Wilmowicz i wsp. 2020), odgrywają istotną rolę w regulacji procesów rozwojowych, w tym w powstawaniu brodawek korzeniowych, m.in. u *M. truncatula* (Shen i wsp. 2019), *P. sativum* i *Lotus japonicus* (Magne i wsp. 2018). Zmiany poziomu *LIBOP* u *L. luteus* warunkują nie tylko powstawanie brodawek korzeniowych, ale też ich poprawne funkcjonowanie, a proces ten skorelowany jest z aktywnością transkrypcyjną *LILbl* kodującego leghemoglobinę (Frankowski i wsp. 2015; Wilmowicz i wsp. 2020). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki analiz qPCR wykazały, że deficyt wody w glebie obniża ekspresję zarówno *LIBOP*, jak i *LILbl* (Fig. 14, 15), co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi, wskazującymi, że zmianom aktywności transkrypcyjnej obu genów towarzyszy obniżenie poziomu wiążanego azotu (Wilmowicz i wsp. 2020). Zmniejszony poziom transkryptu genu kodującego leghemoglobinę podczas suszy odnotowano u *Cajanus cajan* i *G. max* (Nandwal i wsp. 1991; Gordon i wsp. 1997). Ekspresja genu kodującego leghemoglobinę może być modulowana przez ABA i stanowi część mechanizmu aktywowanego przez roślinę podczas reakcji na suszę (Grunwald i wsp. 2009). Jest to możliwe także w brodawkach łubinu, gdzie akumulacji ABA (Fig. 16) towarzyszy wzrost ekspresji *LILbl* (Fig. 15). Zastosowanie γ -PGA w warunkach suszy skutkowało akumulacją transkryptu *LIBOP* (Fig. 14) i *LILbl* (Fig. 15), co w zestawieniu z wynikami analiz mikroskopowych (Fig. 4, 5) koreluje z poprawą integralności struktury brodawek. Zatem polimer wydaje się być wystarczający do przywrócenia funkcjonalności fizjologicznej tych struktur w warunkach stresu. Są to pierwsze dane prezentujące wpływ γ -PGA na ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem brodawek korzeniowych.

Roztwór γ -PGA modyfikuje przemiany hormonalne zachodzące w brodawkach korzeniowych łubinu uprawianego w warunkach suszy glebowej

Hormony roślinne pełnią ważną rolę w odpowiedzi roślin na czynniki środowiska. Z jednej strony zmiany ich endogennego poziomu, wywołane niekorzystnymi warunkami, stanowią dla rośliny sygnał informujący o wystąpieniu stresu (Verma i wsp. 2016; Waadt i wsp. 2022). Z drugiej strony wzrost stężenia hormonów stresowych, takich jak ABA, ET czy JAs, inicjuje kaskadę procesów molekularnych i fizjologicznych

prowadzących do aktywacji mechanizmów obronnych (Wasternack i Hause 2013; Müller i Munné-Bosch 2015; Zhu 2016; Wilmowicz i wsp. 2020). Jednym z najważniejszych regulatorów odpowiedzi rośliny na suszę jest ABA. U *L. luteus* uprawianego w warunkach kontrolnych nie stwierdzono istotnego sygnału fluorescencyjnego w strefie wiązania azotu (Fig. 16), co wskazuje na niski poziom tego hormonu stresowego w warunkach optymalnego nawodnienia. Z kolei w odpowiedzi na suszę glebową zaobserwowano wyraźną akumulację ABA w komórkach strefy wiązania azotu *L. luteus* (Fig. 16), czemu towarzyszyła indukcja ekspresji genu *LIZEP* w brodawkach (Fig. 16), co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Wilmowicz i wsp. 2020) i może sugerować uruchomienie biosyntezy fitohormonu *de novo*. Wskazuje to na uruchomienie szeroko opisywanego w literaturze mechanizmu odpowiedzi stresowej, w którym ABA pełni funkcję centralnego regulatora adaptacji rośliny do suszy (Thompson i wsp. 2000; Audran i wsp. 2001; Park i wsp. 2008). Deficyt wody w glebie aktywuje szlak powstawania ABA poprzez wzrost ekspresji genów kodujących kluczowe enzymy, m.in. ZEP, dioksygenazę 9-*cis*-epoksykarotenoidową (NCED, ang. 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase) oraz oksydazę aldehydu abscysynowego (AAO3, ang. aldehyde oxidase 3) (Audran i wsp. 1998; Seo i wsp. 2000; Iuchi i wsp. 2001). Podobne zależności pomiędzy ekspresją *ZEP* a poziomem ABA w odpowiedzi na deficyt wody obserwowano u *O. sativa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Z. mays* i *S. lycopersicum* (Thompson i wsp. 2000; Huang i wsp. 2019; Kim i wsp. 2019; Xu i wsp. 2023), co potwierdza, że indukcja tego genu stanowi ważny element regulacji biosyntezy ABA podczas deficytu wody. Z drugiej strony wysoki poziom ABA może wywołać negatywne skutki dla symbiotycznego wiązania azotu. Egzogenny fitohormon obniża ekspresję genów nodulacyjnych i hamuje infekcję bakteryjną u *M. truncatula* (Ding i wsp. 2008) oraz redukuje liczbę powstałych brodawek u *T. repens*, *P. vulgaris* oraz *L. japonicus* (Suzuki i wsp. 2004; Biswas i wsp. 2009; Tominaga i wsp. 2009). Z kolei zastosowanie inhibitora biosyntezy ABA odwraca ten efekt oraz poprawia intensywność wiązania azotu u *L. japonicus* i *T. repens* (Suzuki i wsp. 2003; Tominaga i wsp. 2009). Podwyższony poziom ABA w brodawkach korzeniowych *P. sativum* i *P. vulgaris* redukuje zawartość i aktywność leghemoglobiny, prowadząc jednocześnie do spadku działania nitrogenazy (Nagata i Suzuki 2014). Taki wpływ fitohormonu nie jest wykluczony także u łubinu, biorąc pod uwagę zmiany poziomu mRNA genu *LILbl* w brodawkach korzeniowych (Fig. 15) oraz zredukowaną liczbę brodawek wykształconych w warunkach suszy (Fig. 2). Udział ABA w regulacji nodulacji nie jest jednak jednoznaczny. Niewrażliwe na ten fitohormon mutanty *L.*

japonicus wytwarzają podobną liczbę brodawek korzeniowych jak rośliny typu dzikiego (Biswas i wsp. 2009), jednak traktowanie tego gatunku ABA zwiększa tempo nodulacji oraz zdolność wiązania azotu (Tominaga i wsp. 2009).

Zastosowanie γ -PGA w warunkach deficytu wody gwałtownie obniżyło ekspresję *LIZEP* w brodawkach korzeniowych łubinu, nawet poniżej poziomu kontrolnego (Fig. 16), co świadczy o molekularnym łagodzeniu stresowej odpowiedzi osmotycznej już na etapie wczesnej biosyntezy ABA. Jednak mimo inhibicji *LIZEP* wysoki poziom ABA utrzymuje się w tkankach symbiotycznych. Konfrontacja z literaturą ujawnia gatunkowo-specyficzną odpowiedź. W warunkach suszy γ -PGA zwiększa ekspresję genów *BnZEP*, *BnNCED3* i *BnAAO4* oraz akumulację ABA u *B. napus* (Xu i wsp. 2020), z kolei u *Z. mays* prowadzi do gromadzenia ABA w liściach (Ma i wsp. 2022). Rozbieżność z danymi uzyskanymi u łubinu wskazuje na odmienny mechanizm działania polimeru. Obniżona ekspresja *LIZEP* w brodawkach korzeniowych *L. luteus* traktowanych γ -PGA w warunkach suszy i utrzymujący się wysoki poziom ABA (Fig. 16) mogą wynikać z wcześniejszej akumulacji fitohormonu w tkankach podczas działania stresu. Nie można również wykluczyć udziału transportu ABA z innych organów lub regulacji dalszych etapów jego powstawania i/lub katabolizmu. Wyniki te sugerują, że γ -PGA może ograniczać lokalną aktywację szlaku biosyntezy ABA na poziomie ekspresji *LIZEP*, jednak nie prowadzi do natychmiastowego obniżenia zawartości tego hormonu w brodawkach korzeniowych. Podobne rozbieżności pomiędzy poziomem transkryptów genów biosyntezy ABA a zawartością samego hormonu obserwowano u *A. thaliana*, *N. plumbaginifolia*, *V. vinifera*, a także *M. truncatula*, gdzie sugerowano transport hormonu pomiędzy organami oraz regulację jego katabolizmu (Taylor i wsp. 2000; Ferguson i Mathesius 2003; Suzuki i wsp. 2004; Ding i wsp. 2008; Speirs i wsp. 2013).

Etylen, jako silny hormon stresowy, wykazuje zmienną dynamikę tempa biosyntezy w odpowiedzi na bodźce środowiskowe (Ecker 1995). Susza silnie indukowała w brodawkach łubinu ekspresję genów *LIACS* i *LIACO* kodujących kluczowe enzymy biosyntezy tego fitohormonu (Fig. 17), czemu towarzyszyła akumulacja bezpośredniego prekursora – ACC (Fig. 18), co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi (Wilmowicz i wsp. 2020). W badaniach nad *A. thaliana* oraz *Z. mays* wykazano, że biostymulatory w postaci hydrolizatów białka regulują ekspresję genów *ACS* i *ACO* poprzez interakcje ze szlakami sygnałowymi auksyn, ABA oraz RFT, co prowadzi do optymalizacji poziomu ET w warunkach stresowych (Ertani i wsp. 2013; Colla i wsp. 2015). W niektórych przypadkach obserwowano obniżenie ekspresji genów *ACO*, co

sugeruje mechanizm ograniczający biosyntezę ET przy jednoczesnym utrzymaniu funkcji sygnałowej ACC (Bulgari i wsp. 2015).

Zgodnie z panującym obecnie przekonaniem ACC nie jest jedynie metabolitem pośrednim w biosyntezie ET i rezerwuarem umożliwiającym szybką regulację poziomu tego fitohormonu, ale pełni on również funkcję niezależnej cząsteczki sygnałowej regulującej liczne procesy rozwojowe (Polko i Kieber 2019). Hipotezę tę potwierdzają wyniki, w których wykazano, że ACC moduluje rozwój włóśników czy odpowiedź na uszkodzenia ściany komórkowej poprzez szlaki transdukcji sygnału niezależne od receptorów etylenu – ETR1 (ang. *ethylene-response 1*) (Mou i wsp. 2020). Biorąc pod uwagę akumulację tego związku w brodawkach łubinu zarówno w suszy, jak i po aplikacji γ -PGA (Fig. 18), można przypuszczać, że pełni on ważną rolę w pośredniczeniu reakcji na stres i nabywaniu tolerancji wywołanej działaniem polimeru. Należy nadmienić, że część puli tego ACC może być uwalniana do ryzosfery, gdzie staje się dostępna dla bakterii zasiedlających strefę korzeniową. Posiadają one deaminazę ACC wykorzystującą prekursor ET jako źródło azotu, a rozkładając go do amoniaku i α -ketomaślanu, prowadzą jednocześnie do obniżenia poziomu ACC w tkankach roślinnych, a tym samym redukcji biosyntezy stresowego fitohormonu (Glick, 2014; Saleem i wsp. 2007; Gamalero i Glick, 2015).

Istotnym elementem regulacji hormonalnej w organach symbiotycznych *L. luteus* jest zmiana rozmieszczenia JA pod wpływem stresu abiotycznego. W warunkach optymalnego nawodnienia obserwowano lokalizację tego fitohormonu głównie w komórkach parenchymy oraz endodermie otaczającej strefę wiązania azotu (Fig. 19). Taki wzorzec dystrybucji, wskazuje, że w stanie homeostazy może on pełnić funkcję regulatora integralności peryferyjnych tkanek brodawki, utrzymując barierę ochronną przy jednoczesnym ograniczeniu jego bezpośredniego wpływu na procesy zachodzące wewnątrz symbiosomów, gdzie odnotowano jedynie słaby, rozproszony sygnał (Fig. 19). Deficyt wody prowadził do wyraźnej zmiany tego wzorca. Obserwowano spadek intensywności sygnału JA w komórkach parenchymy przy jednoczesnym jego przemieszczeniu do strefy wiązania azotu oraz w okolicę wiązek przewodzących (Fig. 19). Zjawisko to sugeruje mobilizację JAs jako mediatorów odpowiedzi adaptacyjnej. Przemieszczenie JA do strefy wiązania azotu może pełnić dwojaką rolę: bezpośrednio wpływać na aktywność metaboliczną bakteroidów lub modulować przepuszczalność bariery tlenowej brodawki, co stanowi jeden z klasycznych mechanizmów regulacji aktywności symbiotycznej w warunkach suszy (Mabood i wsp. 2006; Sun i wsp. 2006).

Jednocześnie obecność JA w pobliżu wiązek przewodzących (Fig. 19) może sugerować jego udział w sygnalizacji systemicznej, polegającej na przesyłaniu informacji o stanie fizjologicznym organów symbiotycznych do części nadziemnej i uruchamianiu mechanizmów adaptacji do stresu (Wang i wsp. 2021; Szechyńska-Hebda i wsp. 2022). Taka sytuacja występuje u *S. lycopersicum*, ponieważ sygnały generowane w korzeniach indukują akumulację JA w liściach (Wang i wsp. 2022a). Ma to szczególne znaczenie w warunkach stresu. Deficyt wody u *A. thaliana* indukuje sygnalizację JA w korzeniach, prowadząc do zmian rozwojowych, np. różnicowania ksylemu, i wpływa na gospodarkę wodną całej rośliny (Valenzuela i wsp. 2016). Natomiast w liściach *Populus euphratica* JAs współdziałają z ABA w zamykaniu aparatów szparkowych, zwiększając efektywność wykorzystania wody (Rao i wsp. 2023). Akumulacja JA w strefie wiązania azotu brodawek łubinu może mieć istotne znaczenie funkcjonalne, gdyż JAs u roślin strączkowych często ograniczają liczbę nowo powstających brodawek. Jednak z drugiej strony w warunkach stresowych mogą stabilizować funkcjonowanie istniejących już brodawek (Hause i Schaarschmidt 2009; Nagata i Suzuki 2014; Guo i wsp. 2024). Zastosowanie γ -PGA istotnie zmieniało lokalizację JA w brodawkach korzeniowych *L. luteus*. Pomimo wcześniejszego wykazania niemal całkowitego wyciszenia ekspresji genu *LLOX* (Fig. 20) obserwowano wyraźną akumulację JA, szczególnie w obrębie strefy wiązania azotu (Fig. 19). Prezentowane wyniki są pierwszymi pokazującymi wpływ γ -PGA na lokalizację JA. Dotychczas wykazano jednak, że inne biostymulatory (hydrolizaty białkowe i ekstrakty z alg) w warunkach stresowych prowadzą do przejściowego wzrostu poziomu JA oraz aktywacji genów odpowiedzi stresowej zależnych od tego hormonu (Bulgari i wsp. 2015; Colla i wsp. 2015). Dostępne dane sugerują, że γ -PGA wpływa na szlak biosyntezy i transdukcji sygnału JAs w warunkach suszy poprzez regulację ekspresji genów, *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR* i *TIFY/JAZ*. Jednocześnie γ -PGA wpływa na interakcje hormonalne – szczególnie z ABA – wzmacniając odpowiedź na suszę, co prowadzi do zmian w ekspresji genów stresowych i regulacji aparatów szparkowych (de Ollas i wsp. 2015; Ma i wsp. 2024).

Zależne od γ -PGA modyfikacje proteomu korzeni *L. luteus* w odpowiedzi na suszę

W celu uzyskania kompleksowego obrazu zmian zachodzących w korzeniach *L. luteus* w odpowiedzi na stres suszy oraz γ -PGA przeprowadzono analizy proteomiczne. W przeciwieństwie do badania pojedynczych parametrów fizjologicznych dwuwymiarowa elektroforeza białek w połączeniu z metodą MALDI-TOF/TOF

umożliwiła identyfikację białek zaangażowanych w procesy adaptacyjne do suszy i indukowanych przez γ -PGA (Tabela 12). Stres suszy prowadził do pojawienia się nowych plamek białkowych jak i zanikania niektórych spośród pojawiających się w kontroli. W wariancie kontrolnym dominowały białka związane z podstawowym metabolizmem komórkowym (Tabela 12), zwłaszcza enzymy uczestniczące w przemianach węglowodanów oraz ich metabolizmie w mitochondriach, m.in. syntaza sacharozy, która, rozkładając ten cukier, dostarcza bakteroidom składników odżywczych; izoformy aldolazy fruktozo-bisfosforanowej metabolizujące cukry; dehydrogenazę jabłczanową katalizującą utlenianie jabłczanu do szczawiooctanu oraz fosfomutazę i dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego biorące udział w procesie glikolizy. Ich obecność sugeruje intensywny metabolizm energetyczny komórek korzeni w warunkach optymalnego nawodnienia. W tej grupie zidentyfikowano również enzymy uczestniczące w utrzymaniu homeostazy redoks poprzez unieczynnianie H_2O_2 (peroksydazy) oraz regulację cyklu askorbinianowo-glutationowego (reduktaza monodehydroaskorbinowa) (Leterrier i wsp. 2005). Wskazuje to na zachowanie właściwego balansu RFT w optymalnych warunkach. Natomiast lakaza, mutaza UDP-arabinozy, lipooksygenaza, aneksyna mogą odpowiadać za utrzymanie właściwej struktury ścian i błon komórkowych w brodawkach.

Wśród zidentyfikowanych w warunkach suszy białek szczególnie istotne były enzymy glikolizy, takie jak aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanowa, której obecność wskazuje na utrzymanie funkcjonowania szlaków energetycznych w warunkach ograniczonej dostępności wody. Działanie tych enzymów u *Salicornia europaea*, *A. thaliana*, *Thellungiella halophila* i *Setaria italica* dostarcza energii niezbędnej do aktywacji mechanizmów obronnych (Wang i wsp. 2009; Kosová i wsp. 2011; Pan i wsp. 2018). W warunkach suszy profil proteomiczny uległ wyraźnemu przesunięciu w kierunku białek odpowiedzi stresowej, przy czym jednocześnie obserwowano te związane z metabolizmem podstawowym, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Obecność oksydazy ACC w wariancie stresowym wskazuje na aktywację szlaku biosyntezy ET, co pozostaje w zgodzie z analizami qPCR oraz immunolokalizacją prekursora tego fitohormonu (Fig. 18). Jednocześnie identyfikacja akwaporyny PIP2-1 sugeruje, że regulacja transportu wody przez błony komórkowe stanowi istotny element odpowiedzi adaptacyjnej korzeni na deficyt wody, gdyż działanie akwaporyn w warunkach suszy umożliwia utrzymanie minimalnego przepływu wody w tkankach korzenia (Maurel i wsp. 2015). W odpowiedzi na stres suszy pojawiły się również białka

opiekuńcze (chaperony), w tym kompleksy HSP70-90 oraz typu Cpn60/TCP, pełniące rolę w utrzymaniu prawidłowego fałdowania białek. Determinują przez to ich funkcję oraz zapobiegają agregacji i proteolizie w warunkach stresowych (Liberek i wsp. 2008; Cox i wsp. 2014). Indukcja chaperonów stanowi jeden z najbardziej konserwatywnych mechanizmów ochrony komórki przed uszkodzeniami wywołanymi stresem środowiskowym (Wang i wsp. 2004; Kosová i wsp. 2011). Obecność tubuliny α wskazuje na przebudowę cytoszkieletu w odpowiedzi na zmiany potencjału wodnego komórki. Taka reorganizacja jest często obserwowana w warunkach stresu osmotycznego i odgrywa ważną rolę w utrzymaniu integralności komórki oraz regulacji transportu wewnątrzkomórkowego (Nick 2013). W suszy zidentyfikowano także kalmodulinę, która jest zaangażowana w sygnalizację wapniową w komórce, będącą częścią szeroko opisanego w literaturze mechanizmu transdukcji sygnału stresowego (Reddy i wsp. 2011). Badania przeprowadzone przez Huang i wsp. (2014) na liściach *Poncirus trifoliata* wykazały, że stres suszy skutkuje akumulacją kalmoduliny, która koreluje ze zwiększoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT) i obniżeniem poziomu RFT, wskazując na udział tego białka w utrzymaniu homeostazy redoks. Susza podnosi ekspresję genów kodujących kalmodulinę u *A. thaliana*, *Z. mays* i *G. max* (Wu i wsp. 2025; Yu i wsp. 2021). U ostatniego z gatunków białka wiążące kalmodulinę (ang. *calmodulin-binding proteins*) regulują gospodarkę wodną, akumulację osmolitów (np. proliny) oraz ekspresję genów stresowych, co zwiększa tolerancję na suszę (Yu i wsp. 2021).

Reduktaza leghemoglobiny katalizuje redukcję leghemoglobiny z formy nieaktywnej (Lb Fe^{3+}) do funkcjonalnej formy (Lb Fe^{2+}) przy użyciu nukleotydów pirydynowych jako reduktorów (Becana i Klucas 1990). W warunkach stresu leghemoglobina ma tendencję do spontanicznego utleniania do nieaktywnej formy (Jun i wsp. 1994). Jednak w korzeniach łubinu obserwowano podczas suszy pojawienie się reduktazy leghemoglobiny (Tabela 12). Może to być związane z mechanizmem adaptacji polegającym na wzmożonej redukcji leghemoglobiny i utrzymaniu jej wysokiego poziomu celem usprawnienia procesu wiązania azotu w niesprzyjających warunkach.

Zastosowanie γ -PGA w warunkach suszy modyfikowało profil proteomiczny korzeni *L. luteus*. Oprócz białek indukowanych wcześniej przez stres pojawiły się także białka związane z gospodarką redoks oraz procesami detoksykacji. Szczególnie istotna była obecność syntazy cysteiny, enzymu kluczowego dla biosyntezy antyoksydanta – glutationu. Wynik ten wskazuje, że poza aktywnie działającymi antyoksydantami

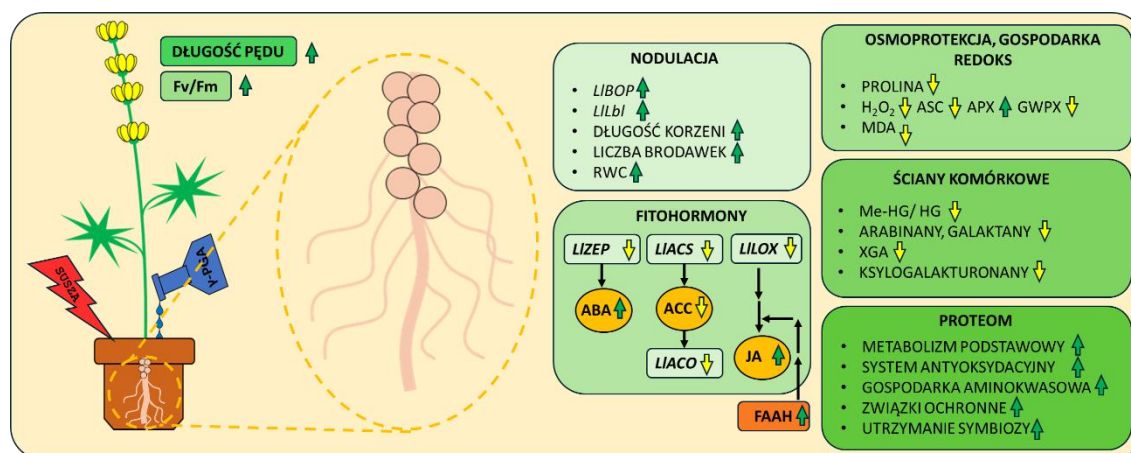
enzymatycznymi (Fig. 8) ważny element ochrony stanowią antyoksydanty nieenzymatyczne. Obecność białek związanych z metabolizmem azotu i aminokwasów, takich jak syntetaza glutaminy oraz aminotransferaza asparaginianowa, może wskazywać na udział γ -PGA w utrzymywaniu symbiozy z bakteriami ryzosferowymi w warunkach suszy. Na szczególną uwagę zasługuje identyfikacja enzymów uczestniczących w biosyntezie flawonoidów, m.in. reduktazy izoflawonowej oraz syntazy flawonolu. Flawonoidy pełnią funkcję silnych przeciwutleniaczy, a także związków wymaganych do inicjacji interakcji symbiotycznych z bakteriami brodawkowymi (Shomali i wsp. 2022; Patil i wsp. 2024). Egzogenny γ -PGA spowodował pojawienie się białka szoku chłodu pochodzenia bakteryjnego (*Rhizobium*), które należy do grupy białek stabilizujących RNA oraz regulujących translację w warunkach stresu, np. zapobiegając tworzeniu niefunkcjonalnych struktur drugorzędowych mRNA (Juntawong i wsp. 2013; Zhang i wsp. 2022).

Prezentowane rezultaty wskazują, że γ -PGA działa jako modulator odpowiedzi proteomicznej korzeni na suszę. Nie tylko ogranicza negatywne skutki stresu, lecz aktywuje mechanizmy adaptacyjne obejmujące wzmocnienie systemów antyoksydacyjnych, modyfikację metabolizmu aminokwasów oraz zwiększenie syntezy metabolitów wtórnych o właściwościach ochronnych.

6. WNIOSKI

Uzyskane w pracy wyniki dostarczyły nowych informacji na temat zdolności γ -PGA do łagodzenia skutków suszy glebowej w korzeniach *L. luteus*. Polimer stosowany na początku suszy skutecznie chroni metabolizm podstawowy i gospodarkę wodną, podczas gdy jego aplikacja pod koniec trwania stresu wpływa pozytywnie na nodulację i funkcjonowanie brodawek. Roztwór o wyższym stężeniu działa nie tylko jako biostymulator wspomagający wzrost, ale także przesuwa granice tolerancji rośliny na stres, utrzymując symbiozę z bakteriami w niekorzystnych warunkach. Ponadto wzmacnia potencjał antyoksydacyjny, a także modyfikuje skład ścian komórkowych oraz homeostazę lipidową, umożliwiając zachowanie integralności struktury brodawek korzeniowych i pozwalając na utrzymanie ich funkcjonalności w warunkach stresu. Przejawem uruchomienia przez γ -PGA mechanizmów adaptacyjnych jest ograniczenie wywołanej suszą aktywacji szlaków fitohormonów stresowych. Podniesienie tolerancji *L. luteus* na stres suszy pod wpływem γ -PGA wynika także ze zdolności tego polimeru do modyfikacji profilu białkowego korzeni w kierunku metabolizmu aminokwasów oraz zwiększenia syntezy związków ochronnych.

Na podstawie wszystkich prezentowanych wyników zaproponowano zintegrowany model działania γ -PGA w korzeniach łubinu w warunkach suszy (Schemat 7).



Schemat 7. Hipotetyczny model działania γ -PGA w korzeniach *Lupinus luteus* w warunkach suszy, na podstawie własnych wyników.

7. LITERATURA

1. **Abdel Latif A.A.H., Kordrostami M., Zakir A., Zaki H., Saleh O.M.** (2019) Eustress with H₂O₂ Facilitates Plant Growth by Improving Tolerance to Salt Stress in Two Wheat Cultivars. *Plants* 8: 303.
2. **Abdi G., Chatterjee A., Mondol M.S.A., Akbar U., Mukherjee A., Susmitha T.** (2026) The AsA–GSH Cycle: A Vital Line of Defense Against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in Plants. W: *Plant Signaling Molecules in Regulation of ROS-Scavenging System* (red. N. Iqbal, N.A. Khan, A. Ferrante), pp. 315–334. Springer, Singapore.
3. **Abedi T., Pakniyat H.** (2010) Antioxidant enzymes changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aust. J. Plant Physiol.* 46: 27–34.
4. **Abid M., Ali S., Qi L.K., Zahoor R., Tian Z., Jiang D., Snider J.L., Dai T.** (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci. Rep.* 8: 4615.
5. **Abrahám E., Hourton-Cabassa C., Erdei L., Szabados L.** (2010) Methods for determination of proline in plants. *Methods Mol. Biol.* 639: 317–331.
6. **Acemi A., Tırhı D., Yıldız S., Özen F.** (2021) Developmental responses of perennial ryegrass, red fescue, and Kentucky bluegrass to In vitro chitosan treatments. *Biotech Stud.* 30: 63–70.
7. **Afzal M., Habib N., Ashraf M., Ali Q., Ali S.** (2025) Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Coordinate to Improve Photosynthesis, Oxidative Defense, Osmoregulation, and Ions Homeostasis in Pea (*Pisum sativum* L.) Under Drought. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 25: 2534–2558.
8. **Ahemad M., Khan M.S.** (2010) Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium leguminosarum*. *Crop Prot.* 29: 325–329.
9. **Ahemad M., Khan M.S.** (2011a) Toxicological assessment of selective pesticides towards plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 58: 169–187.
10. **Ahemad M., Khan M.S.** (2011b) *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. *J. Pest Sci.* 84: 123–131.
11. **Ahemad M., Khan M.S.** (2011c) Effect of pesticides on plant growth-promoting traits of greengram-symbiont, *Bradyrhizobium* sp. strain MRM6. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86: 384–388.
12. **Ahemad M., Khan M.S.** (2012a) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* 86: 945–950.
13. **Ahemad M., Khan M.S.** (2012b) Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. *Ann. Microbiol.* 62: 1531–1540.

14. **Ahemad M., Khan M.S.** (2012c) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek, using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451–459.
15. **Ahemad M., Khan M.S.** (2012d) Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRP1. *Emirates J. Food Agric.* 24: 334–343.
16. **Ahemad M., Khan M.S.** (2012e) Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. *Acta Physiol. Plant.* 34: 245–254.
17. **Ahemad M., Kibret M.** (2013) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26: 1–20.
18. **Ahmad N., Malagoli M., Wirtz M., Hell R.** (2016) Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. *BMC Plant Biol.* 16: 247.
19. **Ahmed E., Holmström S.J.** (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7: 196–208.
20. **Ainsworth E.A., Ort D.R.** (2010) How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiol.* 154: 526–530.
21. **Akram N.A., Shafiq F., Ashraf M.** (2017) Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 8: 613.
22. **Aksmann A., Pokora W., Baścik-Remisiewicz A., Dettlaff-Pokora A., Tukaj Z.** (2016) High hydrogen peroxide production and antioxidative enzymes expression in the *Chlamydomonas reinhardtii* cia3 mutant with an increased tolerance to cadmium and anthracene. *Phycol. Res.* 64: 300–311.
23. **Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E.** (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24: 1337–1344.
24. **Almeida J.M., Fidalgo F., Confraria A., Santos A., Pires H., Santos I.** (2005) Effect of hydrogen peroxide on catalase gene expression, isoform activities and levels in leaves of potato sprayed with homobrassinolide and ultrastructural changes in mesophyll cells. *Funct. Plant Biol.* 32: 707–720.
25. **Álvarez-Aragón R., Palacios J., Ramirez-Parra E.** (2023) Rhizobial symbiosis promotes drought tolerance in *Vicia sativa* and *Pisum sativum*. *Environ. Exp. Bot.* 208: 105268.
26. **Al-Wahili M., Al-Manhel A., Al-Ali R., Altemimi A.** (2023) Poly-gamma-glutamic acid: a comprehensive overview of biosynthesis, characteristics, and emerging applications. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 13: e10075.
27. **Apel K., Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373–399.
28. **Arias-Gaguancela O., Aziz M., Chapman K.D.** (2023) Fatty acid amide hydrolase and 9-lipoxygenase modulate cotton seedling growth by ethanolamide oxylipin levels. *Plant Physiol.* 191: 1234–1253.

29. **Asada K.** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391–396.
30. **Asgari-Targhi G., Iranbakhsh A., Ardebili Z.O.** (2018) Potential benefits and phytotoxicity of bulk and nano-chitosan on the growth, morphogenesis, physiology, and micropropagation of *Capsicum annuum*. *Plant Physiol. Biochem.* 127: 393–402.
31. **Ashiuchi M.** (2010) Occurrence and biosynthetic mechanism of poly- γ -glutamic acid. W: Amino-acid homopolymers occurring in nature, vol. 15. Springer, Berlin: 77–93.
32. **Ashiuchi M., Kamei T., Baek D.H., Shin S.Y., Sung M.H., Soda K., Yagi T., Misono H.** (2001) Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 764–769.
33. **Ashiuchi M., Kamei T., Misono H.** (2003) Poly- γ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 23: 101–106.
34. **Ashiuchi M., Soda K., Misono H.** (1999) A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 6–12.
35. **Asseng S., Ewert F., Martre P., Rötter R.P., Jamieson P.D., Cammarano D., Kimball B.A., Ottman M.J., Wall G.W., White J.W., Reynolds M.P., Alderman P.D., Prasad P.V.V., Aggarwal P.K., Anothai J., Basso B., Biernath C., Challinor A.J., De Sanctis G., Doltra J., Fereres E., Garcia-Vila M., Gayler S., Hoogenboom G., Hunt L.A., Izaurrealde R.C., Jabloun M., Jones C.D., Kassie B.T., Kersebaum K.C., Koehler A.K., Müller C., Naresh Kumar S., Nendel C., O’Leary G., Olesen J.E., Palosuo T., Priesack E., Eyshi Rezaei E., Ruane A.C., Semenov M.A., Shcherbak I., Stöckle C., Stratonovitch P., Streck T., Supit I., Tao F., Thorburn P.J., Waha K., Wang E., Wallach D., Wolf J., Zhao Z., Zhu Y.** (2015) Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Clim. Change* 5: 143–147.
36. **Audran C., Borel C., Frey A., Sotta B., Meyer C., Simonneau T., Marion-Poll A.** (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 118: 1021–1028.
37. **Audran C., Lietenberg S., Gonneau M., North H., Frey A., Tap-Waksman K., Vartanian N., Marion-Poll A.** (2001) Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to drought stress and during seed development. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1161–1173.
38. **Avin-Wittenberg T.** (2019) Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environ.* 42: 1045–1053.
39. **Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S.** (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014: 360438.
40. **Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L.** (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9: 1473.

41. **Bajaj I., Lele S.** (2011) Poly (γ -glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour. Technol.* 102: 5551–5561.
42. **Bajaj I.B., Singhal R.S.** (2009) Enhanced production of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 133–141.
43. **Bala S., Asthir B., Bains N.S.** (2016) Syringaldazine Peroxidase Stimulates Lignification by Enhancing Polyamine Catabolism in Wheat during Heat and Drought Stress. *Cereal Res. Commun.* 44: 561–571.
44. **Bandurska H., Jóźwiak W.** (2010) Comparison of the effects of drought on peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* and *Lolium perenne*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 79: 113–120.
45. **Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P.** (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378: 1–33.
46. **Baxter A., Mittler R., Suzuki N.** (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65: 1229–1240.
47. **Becana M., Klucas R.V.** (1990) Enzymatic and nonenzymatic mechanisms for ferric leghemoglobin reduction in legume root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7295–7299.
48. **Biswas B., Chan P.K., Gresshoff P.M.** (2009) A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol. Plant* 2: 487–499.
49. **Blake L., Goulding K.** (2002) Effects of atmospheric deposition, soil pH and acidification on heavy metal contents in soils and vegetation of semi-natural ecosystems at Rothamsted Experimental Station, UK. *Plant Soil* 240: 235–251.
50. **Blancaflor E.B., Kilaru A., Keereetaweep J., Khan B.R., Faure L., Chapman K.D.** (2014) *N-Acylethanolamines*: lipid metabolites with functions in plant growth and development. *Plant J.* 79: 568–583.
51. **Blum A.** (2011) Plant breeding for water-limited environments. Springer.
52. **Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
53. **Bray E.A.** (2002) Absciscic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ.* 25: 153–161.
54. **Braybrook S.A., Hofte H., Peaucelle A.** (2012) Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: insights for cell growth. *Plant Signal. Behav.* 7: 1037–1041.
55. **Briat J.F., Dubos C., Gaymard F.** (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 20: 33–40.
56. **Brunet J., Inouye D.W., Wilson Rankin E.E., Giannini T.C.** (2025) Global change aggravates drought, with consequences for plant reproduction. *Ann. Bot.* 135: 89–104.
57. **Brunner I., Herzog C., Dawes M.A., Arend M., Sperisen C.** (2015) How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.* 6: 547.

58. **Bulgari R., Cocetta G., Trivellini A., Vernieri P., Ferrante A.** (2015) Biostimulants and crop responses: a review. *Biol. Agric. Hortic.* 31: 1–17.
59. **Burchardt S., Czernicka M., Kućko A., Kapusta M., Zygoridi V., Wilmowicz E.** (2024) Exploring the response of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) root to drought mediated by pathways related to phytohormones, lipid, and redox homeostasis. *BMC Plant Biol.* 24: 1049.
60. **Burton R.A., Gidley M.J., Fincher G.B.** (2010) Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Chem. Biol.* 6: 724–732.
61. **Candela T., Fouet A.** (2006) Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* 60: 1091–1098.
62. **Candela T., Mock M., Fouet A.** (2005) CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J. Bacteriol.* 187: 7765–7772.
63. **Candogan B.N., Sincik M., Buyukcangaz H., Demirtas C., Goksoy A.T., Yazgan S.** (2013) Yield, quality and crop water stress index relationships for deficit-irrigated soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in sub-humid climatic conditions. *Agric. Water Manag.* 118: 113–121.
64. **Carrillo Y., Tissue D.T., Bruna S., Maier C., Dijkstra F.A.** (2022) Drought Impacts on Tree Root Traits Are Linked to Their Decomposability and Net Carbon Release. *Front. For. Glob. Change* 5: 836062.
65. **Cerezini P., Kuwano B., Santos M., Terassi F., Hungria M., Nogueira M.** (2016) Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. *Field Crops Res.* 196: 160–167.
66. **Chaitanya K.V., Rasineni G.K., Reddy A.R.** (2009) Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiol. Plant.* 31: 437–443.
67. **Chang K.C., Liu P.F., Chang C.H., Lin S.W., Sheu J.S., Tsai W.L., Tseng J.W., Shu C.W.** (2022) The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell Biosci.* 12: 1.
68. **Chataut G., Ghimire N., Pandey S., Sah R., Devkota M., Shrestha A.** (2023) Greenhouse Gases Emission from Agricultural Soil: A Review. *J. Agric. Food Res.* 11: 100533.
69. **Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C.** (2011) Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Adv. Bot. Res.* 57: 49–104.
70. **Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.** (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30: 239–264.
71. **Chebli Y., Geitmann A.** (2017) Cellular growth in plants requires regulation of cell wall biochemistry. *Curr. Opin. Cell Biol.* 44: 28–35.
72. **Chen Y., Yao Z., Sun Y., Wang E., Tian C., Sun Y., Liu J., Sun C., Tian L.** (2022) Current Studies of the Effects of Drought Stress on Root Exudates and Rhizosphere Microbiomes of Crop Plant Species. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 2374.
73. **Chen Z., Zhu D., Wu J., Cheng J., Wang L., Zhao J., Lu J., Jiao C., Guo J., Peng L., Guo X., Li Z.** (2018) Identification of differentially accumulated proteins

- involved in regulating independent and combined osmosis and cadmium stress response in *Brachypodium* seedling roots. *Sci. Rep.* 8: 7790.
74. **Chenu K., Van Oosterom E.J., McLean G., Deifel K.S., Fletcher A., Geetika G., Tirfessa A., Mace E.S., Jordan D.R., Sulman R., Hammer G.L.** (2018) Integrating modelling and phenotyping approaches to identify and screen complex traits: transpiration efficiency in cereals. *J. Exp. Bot.* 69: 3181–3194.
 75. **Choudhary N., Sairam R.K., Tyagi A.** (2006) Expression of *Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase* gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J. Biochem. Biophys.* 42: 366–370.
 76. **Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., Rouphael Y.** (2015) Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 375–390.
 77. **Cong L., Deng L., Yao H., Zhang Y., Li H., Wang H., Zhang B., Han Y., Wang J.** (2025) Responses of the Lipxygenase Gene Family to Drought Stress in Broomcorn Millet (*Panicum miliaceum* L.). *Genes* 16: 368.
 78. **Consentino B.B., Vultaggio L., Sabatino L., Ntatsi G., Rouphael Y., Bondi C., De Pasquale C., Guarino V., Iacuzzi N., Capodici G., Mauro R.P.** (2023) Combined effects of biostimulants, N level and drought stress on yield, quality and physiology of greenhouse-grown basil. *Plant Stress* 10: 100268.
 79. **Cook B.I., Mankin J.S., Anchukaitis K.J.** (2018) Climate Change and Drought: From Past to Future. *Curr. Clim. Change Rep.* 4: 164–179.
 80. **Cosgrove D.J.** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 850–861.
 81. **Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E.** (2018) Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.* 9: 1636.
 82. **Cotter M.Q., Teaster N.D., Blancaflor E.B., Chapman K.D.** (2011) *N-acylethanolamine (NAE)* inhibits growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings via *ABI3*-dependent and -independent pathways. *Plant Signal. Behav.* 6: 671–679.
 83. **Couzigou J.-M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H.N., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P.** (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* Maintain Nodule Development and Are Legume Orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* Genes. *Plant Cell* 24: 4498–4510.
 84. **Cox D., Carver J.A., Ecroyd H.** (2014) Preventing α -synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1842: 1830–1843.
 85. **D'Arcy-Lameta A., Ferrari-Iliou R., Contour-Ansel D., Pham-Thi A.T., Zuily-Fodil Y.** (2006) Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Ann. Bot.* 97: 133–140.
 86. **Daher F.B., Braybrook S.A.** (2015) How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Front. Plant Sci.* 6: 523.
 87. **Dai A.** (2013) Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Clim. Change* 3: 52–58.

88. **Dakora F.D., Phillips D.A.** (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245: 35–47.
89. **Daryanto S., Wang L., Jacinthe P.A.** (2016) Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS ONE* 11: 1–15.
90. **Daur I., Bakhshwain A.** (2013) Effect of humic acid on growth and quality of maize fodder production. *Pak. J. Bot.* 45: 21–25.
91. **Dayoub E., Chenu K., Guiguitant J., Quero A., Casadebaig P., Grieu P., Maury P.** (2022) Genotypic differences in root traits to design drought-avoiding soybean ideotypes. *OCL* 29: 31.
92. **de la Canal L., Pinedo M.** (2018) Extracellular vesicles: a missing component in plant cell wall remodeling. *J. Exp. Bot.* 69: 4655–4658.
93. **de Ollas C., Arbona V., Gómez-Cadenas A.** (2015) Jasmonic acid interacts with abscisic acid to regulate plant responses to water stress conditions. *Plant Signal. Behav.* 10: e1078953.
94. **Ding Y., Kalo P., Yendrek C., Sun J., Liang Y., Marsh J.F., Harris J.M., Oldroyd G.E.D.** (2008) Absciscic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 20: 2681–2695.
95. **Doblas V.G., Geldner N., Barberon M.** (2017) The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39: 136–143.
96. **Dong B., Hu Q.** (2024) Optimization of Fermentation Conditions for γ -PGA Production by *Bacillus subtilis* QM3. *Open Access Libr. J.* 11: 1–15.
97. **Droillard M.-J., Bureau D., Paulin A.** (1989) Changes in Activities of Superoxide Dismutases during Aging of Petals of Cut Carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 76: 149–154.
98. **Duan M., Sack L., Baird A.S., Scoffoni C., Jansen S., Zhang S.-B., Li S.** (2026) Cell wall pectin reshapes leaf drought tolerance in dry forests. *Nat. Commun.* 17: 1529.
99. **Dumanović J., Nepuščil T., Ivanišević S., Stojanov N., Prokopijević M.** (2021) The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A review with examples from conifer species. *Plant Biol.* 23: 9–20.
100. **Ecker J.R.** (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667–675.
101. **Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R.** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673–681.
102. **El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F.** (2010) Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs* 8: 968–987.
103. **Erice G., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M., Avice J., Ourry A.** (2007) Effect of drought, elevated CO₂ and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins (VSP) in taproot of nodulated alfalfa before and after cutting. *Plant Sci.* 172: 903–912.
104. **Ermel F.F., Follet-Gueye M.L., Cibert C., Vian B., Morvan C., Catesson A.M., Goldberg R.** (2000) Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan I in cambial derivatives. *Planta* 210: 732–740.

105. **Ertani A., Nicola S., Petrini A., Bulgari R.** (2021) Biostimulants and their role in improving the nutrition of plants in hydroponic conditions. *Acta Hortic.* 1321: 185–190.
106. **Ertani A., Pizzeghello D., Altissimo A., Nardi S.** (2013) Use of meat hydrolyzate derived from tanning residues as plant biostimulant for hydroponically grown maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176: 287–295.
107. **Farooq M., Wahid A., Kobayashi N.S.M.A., Fujita D.B.S.M.A., Basra S.M.A.** (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. W: Sustainable agriculture. Springer, Dordrecht: 153–188.
108. **Farouk S., Amany A.R.** (2012) Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. *Egypt. J. Biol.* 14: 14–26.
109. **Felle H.H., Kondorosi É., Kondorosi Á., Schultze M.** (1999) Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. *Planta* 209: 207–212.
110. **Ferguson B.J., Mathesius U.** (2003) Signaling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 22: 47–72.
111. **Fernández-Pascual M., de Lorenzo C., de Felipe M.R., Rajalakshmi S., Gordon A.J., Thomas B.J., Minchin F.R.** (1996) Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. *Multolupa*. *J. Exp. Bot.* 47: 1709–1716.
112. **Fernández-Pascual M., Pueyo M.J., Lucas M.M.** (2007) Singular Features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* Symbiosis. *Dyn. Soil Dyn. Plant* 1: 1–16.
113. **Feussner I., Wasternack C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 275–297.
114. **Florek J., Kuś J., Podleśny J.** (2012) Stan i perspektywy uprawy łubinu w Polsce. *Frag. Agron.* 29: 7–16.
115. **Florkiewicz A.B., Kućko A., Kapusta M., Burchardt S., Przywieczerski K., Czeszewska-Rosiak G., Wilmowicz E.** (2020) Drought disrupts auxin localization in abscission zone and modifies cell wall structure leading to flower separation in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 6848.
116. **Foyer C.H., Noctor G.** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
117. **Fradera-Soler M., Grace O.M., Jørgensen B., Mravec J.** (2022a) Elastic and collapsible: current understanding of cell walls in succulent plants. *J. Exp. Bot.* 73: 2290–2307.
118. **Fradera-Soler M., Kracun S.K., Westergaard G., Sanders N., Moore J.P., Willats W.G.** (2022b) Are cell wall traits a component of the succulent syndrome? *Front. Plant Sci.* 13: 1043429.
119. **Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Mączkowski R., Marciniak K., Kopcewicz J.** (2014) The generative development of traditional and self-completing (restricted branching) cultivars of white lupin (*Lupinus albus* L.), yellow lupin (*L. luteus* L.) and narrow-leafed lupin (*L. angustifolius* L.) grown under different phytotron conditions. *Plant Breed. Seed Sci.* 69: 47–57.

120. **Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J.** (2015) Molecular cloning of the *BLADE-ON-PETIOLE* gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.* 179: 35–39.
121. **Gacek E.** (2012) Łubin żółty w rolnictwie zrównoważonym. *Hod. Rośl. Nasienn.* 3: 12–18.
122. **Gamalero E., Glick B.R.** (2015) Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiol.* 169: 13–22.
123. **Gavelienė V., Jurkonienė S., Jankovska-Bortkevič E., Švegždienė D.** (2022) Effects of Elevated Temperature on Root System Development of Two *Lupinus* Species. *Plants* 11: 192.
124. **Ge T.D., Sui F.G., Bai L.P., Lu Y.Y., Zhou G.S.** (2006) Effects of water stress on the protective enzyme activities and lipid peroxidation in roots and leaves of summer maize (*Zea mays* L.). *Agric. Sci. China* 5: 291–298.
125. **George P.** (1952) Chemical nature of the secondary hydrogen peroxide compound formed by cytochrome-c peroxidase and horseradish peroxidase. *Nature* 169: 612–613.
126. **Gill S.S., Tuteja N.** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909–930.
127. **Glick B.R.** (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 1–7.
128. **Glick B.R.** (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169: 30–39.
129. **Gong H., Zhu X., Chen K., Wang S., Zhang C.** (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci.* 169: 313–321.
130. **Gong X., Xu Y., Li H., Xie B., Chen J., Chen B.** (2022) Antioxidant activation, cell wall reinforcement, and reactive oxygen species regulation promote resistance to waterlogging stress in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *BMC Plant Biol.* 22: 425.
131. **Gonzalez E.M., Aparicio-Tejo P.M., Gordon A.J., Minchin F.R., Royuela M., Arrese-Igor C.** (1998) Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.* 49: 1705–1714.
132. **González E.M., Larrainzar E., Marino D., Wienkoop S., Gil-Quintana E., Arrese-Igor C.** (2015) Physiological Responses of N₂-Fixing Legumes to Water Limitation. W: *Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment*. Springer, Cham: 1–25.
133. **González-Sama A., Lucas M.M., de Felipe M.R., Pueyo J.J.** (2004) Infection process and nodule development in *Lupinus albus*. *New Phytol.* 163: 249–259.
134. **Gordon A.J., Minchin F.R., Skot L., James C.L.** (1997) Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* 114: 937–946.
135. **Goswami R., Asnacios A., Milani P., Graindorge S., Houlné G., Mutterer J., Hamant O., Chabouté M.-E.** (2020) Mechanical Shielding in Plant Nuclei. *Curr. Biol.* 30: 2013–2025.

136. **Goto A., Kunioka M.** (1992) Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1031–1035.
137. **Gowing D.J., Davies W.J., Jones H.G.** (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus domestica* Borkh. *J. Exp. Bot.* 41: 1535–1540.
138. **Graham P.H., Vance C.P.** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872–877.
139. **Gresshoff P.M., Hayashi S., Biswas B., Mirzaei S., Indrasumunar A., Reid D., Samuel S., Tollenaere A., van Hameren B., Hastwell A., Scott P., Ferguson B.J.** (2015) The value of biodiversity in legume symbiotic nitrogen fixation and nodulation for biofuel and food production. *J. Plant Physiol.* 172: 128–136.
140. **Grunwald U., Guo W., Fischer K., Isayenkov S., Ludwig-Müller J., Hause B., Yan X., Küster H., Franken P.** (2009) Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-treated *Medicago truncatula* roots. *Planta* 229: 1023–1034.
141. **Guinel F.C.** (2015) Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Front. Plant Sci.* 6: 1121.
142. **Guinel F.C., Geil R.D.** (2002) A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its hormonal control. *Physiol. Plant.* 115: 165–173.
143. **Günther C., Schlereth A., Udvardi M., Ott T.** (2007) Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1596–1603.
144. **Guo D., Li J., Liu P., Wang Y., Cao N., Fang X., Wang T., Dong J.** (2024) The jasmonate pathway promotes nodule symbiosis and suppresses host plant defense in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant* 17: 1183–1203.
145. **Gupta A., Rico-Medina A., Caño-Delgado A.I.** (2020) The physiology of plant responses to drought. *Science* 368: 266–269.
146. **Hanby W., Rydon H.** (1946) The capsular substance of *Bacillus anthracis*: With an appendix by P. Bruce White. *Biochem. J.* 40: 297–309.
147. **Hanczakowska E., Księżak J.** (2012) Krajowe źródła białkowych pasz roślinnych jako zamienniki śruty sojowej GMO w żywieniu świń. *Rocz. Nauk. Zoot.* 39: 171–187.
148. **Hara T., Ueda S.** (1982) Regulation of poly glutamate production in *Bacillus subtilis* (natto): Transformation of high PGA productivity. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2275–2281.
149. **Harholt J., Suttangkakul A., Vibe Scheller H.** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* 153: 384–395.
150. **Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M., Zulfikar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V.** (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense system. *Antioxidants* 9: 681.
151. **Hasanuzzaman M., Fujita M.** (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced

- tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 143: 1758–1776.
152. **Haskett T.L., Karunakaran R., Bueno Batista M., Dixon R., Poole P.S.** (2022) Control of nitrogen fixation and ammonia excretion in *Azorhizobium caulinodans*. *PLoS Genet.* 18: e1010276.
 153. **Hauggaard-Nielsen H., Jørnsgaard B., Kinane J., Jensen E.S.** (2008) Grain legume–cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renew. Agric. Food Syst.* 23: 3–12.
 154. **Hause B., Schaarschmidt S.** (2009) The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* 70: 1589–1599.
 155. **He L.M., Neu M.P., Vanderberg L.A.** (2000) *Bacillus licheniformis* g-glutamyl exopolymer: physicochemical characterization and UV interaction. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1694–1701.
 156. **Heng Y., Manish R., Babu V., Lijuan Z., Pengyin C., Rajeev K.V., Henry T.N.** (2018) Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes. *J. Exp. Bot.* 69: 3267–3277.
 157. **Hidangmayum A., Dwivedi P., Katiyar D., Hemantaranjan A.** (2019) Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 25: 313–326.
 158. **Hirsch A.M.** (1992) Tansley Review No. 40. Developmental Biology of Legume Nodulation. *New Phytol.* 122: 211–237.
 159. **Hirsch P.R., Sprent J.I.** (2002) Nodulation in legumes. *Ann. Bot.* 89: 797–798.
 160. **Hodges D., DeLong J., Forney C., Prange R.K.** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611.
 161. **Höfte H., Voxeur A.** (2017) Plant cell walls. *Curr. Biol.* 27: 865–870.
 162. **Hong Y., Zhang W., Wang X.** (2010) Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ.* 33: 627–635.
 163. **Hsueh Y.H., Huang K.Y., Kunene S.C., Lee T.Y.** (2017) Poly-γ-glutamic Acid Synthesis, Gene Regulation, Phylogenetic Relationships, and Role in Fermentation. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 2644.
 164. **Hu X., Jiang M., Zhang J., Zhang A., Lin F., Tan M.** (2007) Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol.* 173: 466–480.
 165. **Huang W.Z.** (2024) Boosting soil health: the role of rhizobium in legume nitrogen fixation. *Mol. Soil Biol.* 15: 129–139.
 166. **Huang Y., Jiao Y., Xie N.K., Guo Y.M., Zhang F., Xiang Z.P., Wang R., Wang F., Gao Q.M., Tian L.F., Li D.P., Chen L.B., Liang M.Z.** (2019) *OsNCED5*, a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene, regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice. *Plant Sci.* 287: 110188.

167. **Huang Y.M., Srivastava A.K., Zou Y.N., Ni Q.D., Han Y., Wu Q.S.** (2014) Mycorrhizal-induced calmodulin mediated changes in antioxidant enzymes and growth response of drought-stressed trifoliate orange. *Front. Microbiol.* 5: 682.
168. **Hura T., Hura K., Ostrowska A.** (2022) Drought-Stress Induced Physiological and Molecular Changes in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 4698.
169. **Hussain S., Khalid M., Saqib M., Ahmad S., Zafar W., Junaid Rao M., Morillon R., Anjum M.A.** (2018) Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiol. Plant.* 40: 10.1007/s11738-018-2710-z.
170. **IMGW-PIB** (2020) Raport: Susza w Polsce – analiza warunków meteorologicznych i hydrologicznych. Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej – Państwowy Instytut Badawczy.
171. **Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)** (2023) Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
172. **Intrigliolo D.S., Pérez D., Risco D., Yeves A., Castel J.R.** (2012) Yield components and grape composition responses to seasonal water deficits in Tempranillo grapevines. *Irrig. Sci.* 30: 339–349.
173. **Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 325–333.
174. **Ivannovics G., Bruckner V.** (1937) The chemistry of the capsule substance of *B. anthracis* and its identity with that of *B. mesentericus*. *Z. Immunitätsforsch.* 90: 304–318.
175. **Jacomassi L.M., Viveiros J.O., Oliveira M.P., Momesso L., de Siqueira G.F., Crusciol C.A.C.** (2022) A Seaweed Extract-Based Biostimulant Mitigates Drought Stress in Sugarcane. *Front. Plant Sci.* 13: 865291.
176. **Jaleel C.A., Manivannan P., Kishorekumar A., Sankar B., Gopi R., Somasundaram R., Panneerselvam R.** (2007) Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 59: 150–157.
177. **Jan R., Khan M.-A., Asaf S., Lubna, Waqas M., Park J.-R., Asif S., Kim N., Lee I.-J., Kim K.-M.** (2022) Drought and UV Radiation Stress Tolerance in Rice Is Improved by Overaccumulation of Non-Enzymatic Antioxidant Flavonoids. *Antioxidants* 11: 917.
178. **Jasińska Z., Kotecki A.** (1994) Rośliny strączkowe. PWN Warszawa.
179. **Jasińska Z., Kotecki A.** (red.) (1999) Szczegółowa uprawa roślin. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław, tom II, 36–38.
180. **Jing B., Shi W., Liu L., Wang Y.** (2023) Poly- γ -glutamic acid improved biological nitrogen fixation, water-nitrogen productivity, and nitrate residue in cotton/soybean intercropping. *J. Sci. Food Agric.* 103: 7284–7292.

181. **Jing B., Shi W., Wang Y.** (2024) Poly- γ -glutamic acid enhanced the yield and photosynthesis of soybeans by adjusting soil aggregates and water distribution. *J. Sci. Food Agric.* 104: 6884–6892.
182. **Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C.** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619–633.
183. **Jumrani K., Bhatia V.S., Kataria S., Koutu G.K., Ansari K.B.** (2024) The interactive effect of high temperature and water deficit stress on nitrogen fixation, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, seed yield and quality in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol. Rep.* 29: 125–140.
184. **Jun H.K., Sarath G., Moran J.F., Becana M., Klucas R.V., Wagner F.** (1994) Characteristics of modified Leghemoglobins isolated from soybean (*Glycine max* Merr.) root nodules. *Plant Physiol.* 104: 1231–1236.
185. **Jung N.U., Giarola V., Chen P., Knox J.P., Bartels D.** (2019) *Craterostigma plantagineum* cell wall composition is remodelled during desiccation and the glycine-rich protein CpGRP1 interacts with pectins through clustered arginines. *Plant J.* 100: 661–676.
186. **Junglee S., Sanders A., Urban L., Sallanon H., Lopez F.** (2014) Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *Am. J. Anal. Chem.* 5: 730–736.
187. **Juntawong P., Sorenson R., Bailey-Serres J.** (2013) Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 74: 1016–1028.
188. **Kalinowski M.** (2014) Łubin żółty z Listy Zalecanych Odmian. *Tyg. Por. Roln.* 6: 22.
189. **Kaliska B., Binkowski M., Broniarz J.** (2024) Demonstracje z zakresu produkcji i wykorzystania krajowych źródeł białka roślinnego na cele paszowe – łubin żółty, łubin wąskolistny. Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych.
190. **Kang L., Wang Y.S., Uppalapati S.R., Wang K., Tang Y., Vadapalli V., Venables B.J., Blancaflor E.B., Mysore K.S.** (2008) Overexpression of a fatty acid amide hydrolase (*AtFAAH*) enhances momentum of the defense response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148: 336–348.
191. **Kapusta F.** (2012) Rośliny strączkowe źródłem białka dla ludzi i zwierząt. W: Pitulec D. (red.), Nauki inżynierskie i technologie. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu: 16–32.
192. **Karademir C., Karademir E., Ekinci R., Berekatoğlu K.** (2011) Yield and fiber quality properties of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under water stress and non-stress conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 12575–12583.
193. **Kärkönen A., Kuchitsu K.** (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112: 22–32.
194. **Kashiwagi J., Krishnamurthy L., Crouch J.H., Serraj R.** (2006) Variability of root length density and its contributions to seed yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. *Field Crops Res.* 95: 171–181.

195. **Kato N., Esaka M.** (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol. Plant.* 105: 321–329.
196. **Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A., Verma D.P.S.** (1995) Overexpression of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387–1394.
197. **Kebede B.** (2017) Intercropping Practice as an Alternative Pathway for Sustainable Agriculture: A review. *Acad. Res. J. Agric. Sci. Res.* 5: 429–452.
198. **Keegstra K.** (2010) Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* 154: 483–486.
199. **Keerio M.** (2001) Nitrogenase activity of soybean root nodules inhibited after heat stress. *J. Appl. Sci.* 1: 297–300.
200. **Khaled H., Fawy H.A.** (2011) Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity. *Soil Water Res.* 6: 21–29.
201. **Khan A., Shen F., Yang L., Xing W., Clothier B.** (2022) Limited Acclimation in Leaf Morphology and Anatomy to Experimental Drought in Temperate Forest Species. *Biology* 11: 1186.
202. **Khan M., Xu H., Hepworth S.R.** (2014) *BLADE-ON-PETIOLE* genes: setting boundaries in development and defense. *Plant Sci.* 215-216: 157–171.
203. **Khan M., Xu M., Murmu J., Tabb P., Liu Y., Storey K., McKim S.M., Douglas S.J., Hepworth S.R.** (2012) Antagonistic interaction of *BLADE-ON-PETIOLE1* and 2 with *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE* regulates lateral organ architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158: 946–963.
204. **Khan R., Ma X., Shah S., Wu X., Shaheen A., Xiao L., Wu Y., Wang S.** (2020) Drought-hardening improves drought tolerance in *Nicotiana tabacum* at physiological, biochemical, and molecular levels. *BMC Plant Biol.* 20: 486.
205. **Kim G-E., Sung J.** (2023) ABA-dependent suberization and aquaporin activity in rice (*Oryza sativa* L.) root under different water potentials. *Front. Plant Sci.* 14: 1219610.
206. **Kim M., Kang Y., Jin E.** (2019) Gene expression analysis of zeaxanthin epoxidase from the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in response to light/dark cycle and salinity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1453–1459.
207. **Kimura K., Tran L.S.P., Uchida I., Itoh Y.** (2004) Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiology* 150: 4115–4123.
208. **Klaassen M.T., Trindade L.M.** (2020) RG-I galactan side-chains are involved in the regulation of the water-binding capacity of potato cell walls. *Carbohydr. Polym.* 227: 115353.
209. **Koodamvetty A., Sibi P.V., Korattyil V.** (2024) Chitosan-induced growth enhancement, piperine production and relative expression of piperine synthase gene in long pepper (*Piper longum* L.). *Plant Sci. Today* 11: 4454.
210. **Kopcewicz J., Szmidt-Jaworska A.** (red.) (2021) Fizjologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

211. **Kopriwa B.M.** (1984) Block-staining tissues with potassium ferrocyanide-reduced osmium tetroxide and lead aspartate for electron microscopic radioautography. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 552–554.
212. **Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T., Renaut J.** (2011) Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* 74: 1301–1322.
213. **Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V., Mittler R.** (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J. Biol. Chem.* 283: 34197–34203.
214. **Koutroubas S.D., Damalas C.A., Fotiadis S., Paschalidis K.A., Korpetis A.L.** (2023) Species, Cultivar and Seasonal Effects on Nodulation and Nitrogen Utilization of Spring Mediterranean Grain Legumes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 23: 4463–4473.
215. **Krasowicz S., Oleszek W., Horabik J., Dębicki R., Jankowiak J., Stuczyński T., Jadczyński J.** (2011) Racjonalne gospodarowanie środowiskiem glebowym Polski. *Probl. Inż. Roln.* 19: 15–24.
216. **Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R.** (2006) The aquaporins. *Genome Biol.* 7: 206.
217. **Kucharska D., Orlikowska T., Maciorowski R.** (2018) Zmiany poziomu proliny w liściach maliny czerwonej (*Rubus idaeus* L.). *Zesz. Probl. Postępów Nauk Roln.* 594: 25–34.
218. **Kučko A., Alché J.D., Tranbarger T.J., Wilmowicz E.** (2022) The acceleration of yellow lupine flower abscission by jasmonates is accompanied by lipid-related events in abscission zone cells. *Plant Sci.* 316: 111173.
219. **Kučko A., Alché J.D., Tranbarger T.J., Wilmowicz E.** (2023) Abscissic acid- and ethylene-induced abscission of yellow lupine flowers is mediated by jasmonates. *J. Plant Physiol.* 290: 154119.
220. **Kučko A., Smoliński D., Wilmowicz E., Florkiewicz A., de Dios Alché J.** (2019a) Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* 256: 1173–1183.
221. **Kučko A., Wilmowicz E., Ostrowski M.** (2019b) Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *J. Plant Physiol.* 236: 51–60.
222. **Kučko A., Wilmowicz E., Pokora W., Alché J.D.** (2020) Disruption of the Auxin Gradient in the Abscission Zone Area Evokes Asymmetrical Changes Leading to Flower Separation in Yellow Lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 3815.
223. **Kundzewicz Z., Krysanova V., Dankers R., Hirabayashi Y., Kanae S., Hattermann F., Huang S., Milly P., Driessen P.P.J., Matczak P., Quevauviller P., Schellnhuber H.** (2016) Differences in flood hazard projections in Europe – their causes and consequences for decision making. *Hydrol. Sci. J.* 62: 1–14.
224. **Kunert K.J., Vorster B.J., Fenta B.A., Kibido T., Dionisio G., Foyer C.H.** (2016) Drought stress responses in soybean roots and nodules. *Front. Plant Sci.* 7: 1–7.

225. **Kuśmierek-Tomaszewska R., Żarski J.** (2021) Assessment of Meteorological and Agricultural Drought Occurrence in Central Poland in 1961–2020 as an Element of the Climatic Risk to Crop Production. *Agronomy* 11: 855.
226. **Ladrera R., Marino D., Larrainzar E., González E.M., Arrese-Igor C.** (2007) Reduced Carbon Availability to Bacteroids and Elevated Ureides in Nodules, But Not in Shoots, Are Involved in the Nitrogen Fixation Response to Early Drought in Soybean. *Plant Physiol.* 145: 539–546.
227. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
228. **Laishram J., Saxena K.G., Maikhuri R.K., Rao K.S.** (2012) Soil quality and soil health: A review. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.* 38: 19–37.
229. **Lal R.** (2015) Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability* 7: 5875–5895.
230. **Lampugnani E.R., Khan G.A., Somssich M., Persson S., Russinova J.** (2018) Building a plant cell wall at a glance. *J. Cell Sci.* 131: jcs207373.
231. **Lang I., Sassmann S., Schmidt B., Komis G.** (2014) Plasmolysis: Loss of Turgor and Beyond. *Plants* 3: 583–593.
232. **Lawlor D.W., Tezara W.** (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.* 103: 561–579.
233. **Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz K.-J.** (2019) The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants* 8: 94.
234. **Lazazzera B.** (1999) Cell-density control of gene expression and development in *Bacillus subtilis*. *Cell Cell Signal. Bact.* 1999: 27–47.
235. **Le Gall H., Philippe F., Domon J.-M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C.** (2015) Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* 4: 112–166.
236. **Lei P., Pang X., Feng X., Li S., Chi B., Xu Z., Xu H.** (2017) The microbe-secreted isopeptide poly- γ -glutamic acid induces stress tolerance in *Brassica napus* L. seedlings by activating crosstalk between H_2O_2 and Ca^{2+} . *Sci. Rep.* 7: 41618.
237. **Lei P., Xu Z., Liang J., Luo J., Zhang Y., Feng X., Xu H.** (2015) Effect of Poly- γ -Glutamic Acid on the Physiological Responses and Calcium Signaling of Rape Seedlings (*Brassica napus* L.) under Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.* 63: 10399–10406.
238. **Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N.** (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature* 529: 84–87.
239. **Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A.** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 138: 2111–2123.
240. **Leucci M.R., Lenucci M.R., Piro G., Dalessandro G.** (2008) Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 165: 1168–1180.
241. **Levesque-Tremblay G., Pelloux J., Braybrook S.A., Müller K.** (2015) Tuning of pectin methylesterification: consequences for development. *Planta* 242: 791–811.

242. **Li X., Wang S., Zhu L., Zhang P., Qi H., Zhang K., Sun H., Zhang Y., Lei X., Li A., Wang Z., Li C., Liu L.** (2025) Leaf hydraulic decline coordinates stomatal and photosynthetic limitations through anatomical adjustments under drought stress in cotton. *Front. Plant Sci.* 16: 1622308.
243. **Liang J., Shi W.** (2021) Poly- γ -glutamic acid improves water-stable aggregates, nitrogen and phosphorus uptake efficiency, water-fertilizer productivity, and economic benefit in barren desertified soils of Northwest China. *Agric. Water Manag.* 245: 106571.
244. **Liang J., Shi W., He Z., Pang L., Zhang Y.** (2019) Effects of poly- γ -glutamic acid on water use efficiency, cotton yield, and fiber quality in the sandy soil of southern Xinjiang, China. *Agric. Water Manage.* 218: 48–59.
245. **Liang Y., Gao B., Zhang X., Yi H., Li J., Zhang W.** (2025) Combined addition of γ -PGA and DCD facilitates phytoremediation of heavy metals and carbon sequestration: A field experiment. *J. Environ. Manage.* 379: 124746.
246. **Liao W., Wang G., Li Y., Wang B., Zhang P., Peng M.** (2016) Reactive oxygen species regulate leaf pulvinus abscission zone cell separation in response to water-deficit stress in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Sci. Rep.* 6: 21542.
247. **Liberek K., Lewandowska A., Zietkiewicz S.** (2008) Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.* 27: 328–335.
248. **Lim S.D., Mayer J.A., Yim W.C., Cushman J.C.** (2020) Plant tissue succulence engineering improves water-use efficiency, water-deficit stress attenuation and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 103: 1049–1072.
249. **Lionetti V., Fabri E., De Caroli M., Hansen A.R., Willats W.G., Piro G., Bellincampi D.** (2017) Three Pectin Methylesterase Inhibitors Protect Cell Wall Integrity for *Arabidopsis* Immunity to *Botrytis*. *Plant Physiol.* 173: 1844–1863.
250. **Liu A., Contador C.A., Fan K., Lam H.-M.** (2018) Interaction and Regulation of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Root Nodules of Legumes. *Front. Plant Sci.* 9: 1860.
251. **Liu B., Asseng S., Müller C., Ewert F., Elliott J., Lobell D.B., Martre P., Ruane A.C., Wallach D., Aggarwal P.K., Rosenzweig C.** (2016) Similar responses of global wheat yield to temperature and *Zea mays*. *Nature Clim. Change* 6: 1130–1136.
252. **Liu C., Fukumoto T., Matsumoto T., Gena P., Frascaria D., Kaneko T., Katsuhara M., Zhong S., Sun X., Zhu Y., Iwasaki I., Ding X., Calamita G., Kitagawa Y.** (2013) Aquaporin *OsPIP1;1* promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiol. Biochem.* 63: 151–158.
253. **Liu L., Shi W., Wang Y.** (2022) Poly- γ -glutamic acid application rate effects on hydraulic properties of sandy soil under wetting-drying cycles conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 86: 904–917.
254. **Liu W., Huang M., Tang H., Han R., Luo Y.** (2025) The effect of salt-drought stress on the growth and physiological characteristics of *Viola tricolor* seedlings. *Front. Plant Sci.* 16: 1552092.
255. **Liu X., Cui H., Zhang B., Song M., Chen S., Xiao C., Tang Y., Liesche J.** (2021) Reduced pectin content of cell walls prevents stress-induced root cell elongation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 72: 1073–1084.

256. **Liu Z., Pi F., Guo X., Guo X., Yu S.** (2019) Characterization of the structural and emulsifying properties of sugar beet pectins obtained by sequential extraction. *Food Hydrocolloid.* 88: 31–42.
257. **Lopez-Moya F., Escudero N., Zavala-Gonzalez E.A., Esteve-Bruna D., Blázquez M.A., Alabadí D., Lopez-Llorca L.V.** (2017) Induction of auxin biosynthesis and *WOX5* repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan. *Sci. Rep.* 7: 16813.
258. **López-Serrano M., Fernández M.D., Pomar F., Pedreño M.A., Ros Barceló A.** (2004) *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J. Exp. Bot.* 55: 423–431.
259. **Lu W.G., Chen Q.S.** (2024) Molecular mechanisms of nitrogen-fixing symbiosis in *Fabaceae*. *Legume Genomics and Genetics* 15: 163–175.
260. **Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S., Groten K., Bernard S., Foyer C.H.** (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J. Exp. Bot.* 56: 417–423.
261. **Luo Z., Guo Y., Liu J., Qiu H., Li M., Zhuang W., Zheng Z.G., Chen X.H., Wu J.Y., Chen S.C.** (2016) Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnol. Biofuels* 9: 134.
262. **Luyten K., Vanderleyden J.** (2000) Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. *Eur. J. Soil Biol.* 36: 1–26.
263. **Łabędzki L., Bąk B.** (2017) Impact of meteorological drought on crop water deficit and crop yield reduction in Polish agriculture. *J. Water Land Dev.* 34: 181–190.
264. **Łotocka B., Kopcińska J., Górecka M., Golinowski W.** (2000) Formation and abortion of root nodule primordia in *Lupinus luteus* L. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 42: 1–11.
265. **Ma H., Li P., Liu X., Xu Z., Zhan J., Xu H.** (2022) Poly- γ -glutamic acid enhanced the drought resistance of maize by improving photosynthesis and affecting the rhizosphere microbial community. *BMC Plant Biol.* 22: 11.
266. **Ma H., Xiao N., Liu Y., Zhang J., Wang L., Zhao H., Xu H.** (2025) Poly- γ -glutamic acid could enhance the salt resistance of maize by collectively increasing the osmotic, ion, and oxidative stresses resistance and enriching the salt-tolerant PGPBs in rhizosphere soil. *Plant Soil* 515: 1179–1196.
267. **Ma X., Ai X., Li C., Wang S., Zhang N., Ren J., Wang J., Zhong C., Zhao X., Zhang H., Yu H.** (2024) A Genome-Wide Analysis of the Jasmonic Acid Biosynthesis Gene Families in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Reveals Their Crucial Roles in Growth and Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 25: 7054.
268. **Mabood F., Souleimanov A., Khan W., Smith DL.** (2006) Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 759–765.
269. **Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik P.C., Sohrabi Y.** (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Aust. J. Crop Sci.* 4: 580–585.

270. **Magne K., Couzigou J.-M., Schiessl K., Liu S., George J., Zhukov V., Sahl L., Boyer F., Iantcheva A., Mysore K.S., Wen J., Citerne S., Oldroyd G.E.D., Ratet P.** (2018) MtNODULE ROOT1 and MtNODULE ROOT2 are essential for indeterminate nodule identity. *Plant Physiol.* 178: 295–316.
271. **Malerba M., Cerana R.** (2016) Chitosan Effects on Plant Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 996.
272. **Mao L.C., Wang G.Z., Zhu C.G., Pang H.Q.** (2007) Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits. *Plant Sci.* 172: 400–405.
273. **Masson-Delmotte V., Zhai P., Pirani A., Connors S.L., Péan C., Berger S., Caud N., Chen Y., Goldfarb L., Gomis M.I., Huang M., Leitzell K., Lonnoy E., Matthews J.B.R., Maycock T.K., Waterfield T., Yelekçi O., Yu R., Zhou B.** (2021) Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
274. **Maurel C., Boursiac Y., Luu D. T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L.** (2015) Aquaporins in Plants: From Whole-Plant Physiology to Molecular Structure. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 233–266.
275. **McDougall G.J.** (1991) Cell-Wall-Associated Peroxidases and Lignification during Growth of Flax Fibres. *J. Plant Physiol.* 139: 182–186.
276. **Melo J., Dias T., Santos A.M., Kamah S., Castillo S., Akdi K., Cruz C.** (2026) Microbial Biostimulants Improve Early Seedling Resilience to Water Stress. *Resources* 15: 20.
277. **Menz F.C., Seip H.M.** (2004) Acid Rain in Europe and the United States: An Update. *Environ. Sci. Policy* 7: 253–265.
278. **Miedes E., Vanholme R., Boerjan W., Molina A.** (2014) The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5: 358.
279. **Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R.** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33: 453–467.
280. **Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405–410.
281. **Molina C., Zaman-Allah M., Khan F., Fatnassi N., Horres R., Rotter B., Steinhauer D., Kahl G., Winter P.** (2011) The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. *BMC Plant Biol.* 11: 31.
282. **Moloi M.J., Mwenye O.J., van der Merwe R.** (2016) Differential involvement of ascorbate and guaiacol peroxidases in soybean drought resistance. *S. Afr. J. Sci.* 112: 2016–0028.
283. **Moneo-Sánchez M., Vaquero-Rodríguez A., Hernández-Nistal J., Albornos L., Knox P., Dopico B., Labrador E., Martín I.** (2020) Pectic galactan affects cell wall architecture during secondary cell wall deposition. *Planta* 251: 61.
284. **Moore J.P., Farrant J.M., Driouich A.** (2008) A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signal. Behav.* 3: 102–104.

285. **Mou W., Kao Y.T., Michard E., Huang J.S., Li Z., Wudick M.M., Lizzio M.A., Erwee S., Hilton S.H., Steinhorst L., Kudla J., Van Der Straeten D., Van de Poel B., Feijó J.A.** (2020) Ethylene-independent signaling by the ethylene precursor ACC in *Arabidopsis* ovular pollen tube attraction. *Nat. Commun.* 11: 4082.
286. **Mouradi M., Bouizgaren A., Farissi M., Latrach L., Qaddoury A., Ghoulam C.** (2016) Seed osmopriming improves plant growth, nodulation, chlorophyll fluorescence and nutrient uptake in alfalfa (*Medicago sativa* L.) – rhizobia symbiosis under drought stress. *Sci. Hortic.* 213: 232–242.
287. **Mravec J., Guo X., Hansen A.R., Schüchel J., Kračun S.K.I., Mikkelsen M.D., Mouille G., Johansen I.E., Ulvskov P., Domozych D.S., Willats W.G.T.** (2017) Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiol.* 174: 1051–1066.
288. **Müller M., Munné-Bosch S.** (2015) Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *Plant Physiol.* 169: 32–41.
289. **Munné-Bosch S., Jubany-Marí T., Alegre L.** (2001) Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defenses in chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 24: 1319–1327.
290. **Munns R., Tester M.** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681.
291. **Muñoz-Mayor A., Pineda B., Garcia-Abellán J.O., Antón T., Garcia-Sogo B., Sanchez-Bel P., Bolarin M.C.** (2012) Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *J. Plant Physiol.* 169: 459–468.
292. **Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y.** (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599–605.
293. **Muscolo A., Junker A., Klukas C., Weigelt-Fischer K., Riewe D., Altmann T.** (2015) Phenotypic and Metabolic Responses to Drought and Salinity of Four Contrasting Lentil Accessions. *J. Exp. Bot.* 66: 5467–5480.
294. **Muzammil S., Shrestha A., Dadshani S., Pillen K., Siddique S., Léon J., Naz A.A.** (2018) An ancestral allele of *Pyrroline-5-carboxylate synthase1* promotes proline accumulation and drought adaptation in cultivated barley. *Plant Physiol.* 178: 771–782.
295. **Nagata M., Suzuki A.** (2014) Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation. W: *Leguminous Plants. Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation* (red. T. Ohyama), pp. 111–128. IntechOpen.
296. **Naing A.H., Maung T.T., Kim C.K.** (2021) The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. *Physiol. Plant.* 173: 1992–2012.
297. **Najar I.N., Das S.** (2015) Poly-glutamic acid (PGA) - structure, synthesis, genomic organization and its application: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6: 2258–2280.
298. **Nakano Y., Asada K.** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.

299. **Nandwal A.S., Bharti S., Sheoran I.S., Kaur H.** (1991) Drought effects on carbon exchange and nitrogen fixation in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *J. Plant Physiol.* 138: 125–127.
300. **Nap J.P., Bisseling T.** (1990) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948–954.
301. **Naseem H., Bano A.** (2014) Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharides in drought tolerance. *J. Plant Interact.* 9: 689–701.
302. **Nick P.** (2013) Microtubules, signalling and abiotic stress. *Plant J.* 75: 309–323.
303. **Ogunleye A., Bhat A., Irorere V.U., Hill D., Williams C., Radecka I.** (2015) Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology* 161: 1–17.
304. **Oldroyd G.E.** (2013) Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 252–263.
305. **Oldroyd G.E., Downie J.A.** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519–546.
306. **Oleksiak T., Spyroglou I., Pacoń D., Matysik P., Pernisová M., Rybka K.** (2022) Effect of drought on wheat production in Poland between 1961 and 2019. *Crop Sci.* 62: 728–743.
307. **Ondzighi-Assoume C.A., Chakraborty S., Harris J.M.** (2016) Environmental nitrate stimulates abscisic acid accumulation in *Arabidopsis* root tips by releasing it from inactive stores. *Plant Cell.* 28: 729–745.
308. **Ostaszewska M., Juszczuk I.M., Kołodziejek I., Rychter A.M.** (2014) Long-term sulphur starvation of *Arabidopsis thaliana* modifies mitochondrial ultrastructure and activity and changes tissue energy and redox status. *J. Plant Physiol.* 171: 549–558.
309. **Ott T., van Dongen J.T., Günther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K.** (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15: 531–535.
310. **Öztürk L., Demir Y.** (2002) *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regul.* 38: 259–264.
311. **Palta J.A., Turner N.C., French R.J., Buirchell B.** (2003) Towards improvement of drought resistance in lupin – a crop for acid sandy soils. *J. Exp. Bot.* 54: 2111–2119.
312. **Paluch-Lubawa E., Prosicka B., Polcyn W.** (2022) Expression patterns of maize PIP aquaporins in middle or upper leaves correlate with their different physiological responses to drought and mycorrhiza. *Front. Plant Sci.* 13: 1056992.
313. **Pan J., Li Z., Wang Q., Garrell A.K., Liu M., Guan Y., Zheng J., Jia G.** (2018) Comparative proteomic investigation of drought responses in foxtail millet. *BMC Plant Biol.* 18: 1–19.
314. **Pang X., Lei P., Feng X., Xu Z., Xu H., Liu K.** (2018) Poly- γ -glutamic acid, a bio-chelator, alleviates the toxicity of Cd and Pb in the soil and promotes the establishment of healthy *Cucumis sativus* L. seedling. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25: 19975–19988.

315. **Parastesh F., Asgari Lajayer B., Dell B.** (2025) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Biochar as Drought Defense Tools: A Comprehensive Review of Mechanisms and Future Directions. *Curr. Issues Mol. Biol.* 47: 1040.
316. **Park H.Y., Seok H.Y., Park B.K., Kim S.H., Goh C.H., Lee B.H., Lee C.H., Moon Y.H.** (2008) Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 80–85.
317. **Park Y.B., Cosgrove D.J.** (2015) Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* 56: 180–194.
318. **Patil J.R., Mhatre K.J., Yadav K., Singh G., Sonawane H., Pawar N.** (2024) Flavonoids in plant-environment interactions and stress responses. *Discov. Plants* 1: 68.
319. **Pawlowski K., Bisseling T.** (1996) Rhizobial and actinorhizal nodules: Similarities and differences. *Plant Cell* 8: 1891–1913.
320. **Peaucelle A., Braybrook S.A., Le Guillou L., Bron E., Kuhlemeier C., Höfte H.** (2011) Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 1720–1726.
321. **Pelloux J., Rusterucci C., Mellerowicz E.J.** (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12: 267–277.
322. **Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I.J., Bhuiyan S.H., Faizah N.H., Kiernan S.Q., Mele P.M., Turner G.L., Bergersen F.J.** (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48: 1–17.
323. **Pichon M., Journet E.P., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Barker D.G.** (1992) *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* 4: 1199–1211.
324. **Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C., Bakker P.A.** (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 347–375.
325. **Pigeaire A., Delane R.J., Scymour M., Alkins C.A.** (1992) Predominance of flowers and newly-formed pods in reproductive abscission of *Lupinus angustifolius* L. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 1117–1129.
326. **Podleśny J.** (2005) Rośliny strączkowe w Polsce – perspektywy uprawy i wykorzystanie nasion. *Acta Agrophys.* 6: 213–224.
327. **Pokora W., Reszka J., Tukaj Z.** (2003) Activities of super-oxide dismutase (SOD) isoforms during growth of *Scenedesmus* (Chlorophyta) species and strains grown in bath-cultures. *Acta Physiol. Plant.* 25: 375–385.
328. **Polko J.K., Kieber J.J.** (2019) 1-Aminocyclopropane 1-Carboxylic Acid and Its Emerging Role as an Ethylene-Independent Growth Regulator. *Front. Plant Sci.* 10: 1602.
329. **Porta H., Rocha-Sosa M.** (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130: 15–21.
330. **Prudnikov P.** (2022) Diagnostics of plum resistance to the combined effects of drought and hyperthermia. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 949: 012039.

- 331.**Prusiński J.** (2017a) Łubin żółty. Wydawnictwo Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.
- 332.**Prusiński J.** (2017b) White lupin (*Lupinus albus* L.) – nutritional and health values in human nutrition – a review. *Czech J. Food Sci.* 35: 95–105.
- 333.**Prusiński J., Borowska M.** (2002) Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie. Cz. I. Zastosowanie regulatorów wzrostu w uprawie roślin strączkowych. *Hod. Rośl. Nasienn.* 2: 33–38.
- 334.**Prusiński J., Borowska M., Kaszkowiak E.** (2012) Nodulation of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) depending on the forecrop, seed inoculation with *Bradyrhizobium lupini* and genistein. *J. Cent. Eur. Agric.* 13: 822–836.
- 335.**Qiao M., Hong C., Jiao Y., Hou S., Gao H.** (2024) Impacts of Drought on Photosynthesis in Major Food Crops and the Related Mechanisms of Plant Responses to Drought. *Plants* 13: 1808.
- 336.**Quan J., Zheng W., Tan J., Li Z., Wu M., Hong S.-B., Zhao Y., Zhu Z., Zang Y.** (2022) Glutamic Acid and Poly-γ-glutamic Acid Enhanced the Heat Resistance of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) by Improving Carotenoid Biosynthesis, Photosynthesis, and ROS Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 11671.
- 337.**Ranjan A., Sinha R., Singla-Pareek S.L., Pareek A., Singh A.K.** (2022) Shaping the root system architecture in plants for adaptation to drought stress. *Physiol. Plant.* 174: e13651.
- 338.**Rao S., Tian Y., Zhang C., Qin Y., Liu M., Niu S., Li Y., Chen J.** (2023) The JASMONATE ZIM-domain-OPEN STOMATA1 cascade integrates jasmonic acid and abscisic acid signaling to regulate drought tolerance by mediating stomatal closure in poplar. *J. Exp. Bot.* 74: 443–457.
- 339.**Reddy A.S.N., Ali G.S., Celesuz H., Day I.S.** (2011) Calcium signaling: decoding gene expression responses. *Plant Cell* 23: 38–54.
- 340.**Ren J., Sun L.N., Zhang Q.Y., Song X.S.** (2016) Drought Tolerance Is Correlated with the Activity of Antioxidant Enzymes in *Cerasus humilis* Seedlings. *Biomed Res. Int.* 2016: 9851095.
- 341.**Roig-Oliver M., Bresta P., Nikolopoulos D., Bota J., Flexas J.** (2025) Dynamics of Pectins and Photosynthetic Traits in Sunflower and Tomato Subjected to Gradual Recoveries Preceded by Water Deprivation. *Physiol. Plant.* 177: e70338.
- 342.**Rossen L., Shearman C.A., Johnston A.W., Downie J.A.** (1985) The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA,B,C* genes. *EMBO J.* 4: 3369–3373.
- 343.**Rouphael Y., Colla G.** (2020) Toward a Sustainable Agriculture Through Plant Biostimulants: From Experimental Data to Practical Applications. *Agronomy* 10: 1461.
- 344.**Sabba R.P., Lulai E.C.** (2002) Histological analysis of the maturation of native and wound periderm in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. *Ann. Bot.* 90: 1–10.
- 345.**Sade B., Soylu S., Soylu E.** (2011) Drought and oxidative stress. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 11102–11109.
- 346.**Sairam R.K., Deshmukh P.S., Saxena D.C.** (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant.* 41: 387–394.

347. **Saja-Garbarz D., Kamila K., Ewa K., Myśliwa-Kurdziel B., Gierlikowska B., Kujawska M., Kurdziel M., Saja D.** (2024) The effect of silicon supplementation and drought stress on the deposition of callose and chemical components in the cell walls of the *Brassica napus* roots. *BMC Plant Biol.* 24: 1249.
348. **Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S.** (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635–648.
349. **Savi T., Bertuzzi S., Branca S., Tretiach M., Nardini A.** (2015) Drought-induced xylem cavitation and hydraulic deterioration: risk factors for urban trees under climate change. *New Phytologist* 205: 1106–1116.
350. **Schmidhuber J., Tubiello F.N.** (2007) Global food security under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 19703–19708.
351. **Sénéchal F., Wattier C., Rustérucci C., Pelloux J.** (2014) Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. *J. Exp. Bot.* 65: 5125–5160.
352. **Seo M., Peeters A.J., Koiwai H., Oritani T., Marion-Poll A., Zeevaart J.A., Koornneef M., Kamiya Y., Koshiba T.** (2000) The *ARABIDOPSIS* ALDEHYDE OXIDASE 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 12908–12913.
353. **Serraj R.** (2003) Effects of drought stress on legume symbiotic nitrogen fixation: physiological mechanisms. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1136–1141.
354. **Serraj R., Sinclair T.R., Purcell R.C.** (1999) Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50: 143–155.
355. **Shaban M., Ahmed M., Sun H., Ullah A., Zhu L.** (2018) Genome-wide identification of lipoxygenase gene family in cotton and functional characterization in response to abiotic stresses. *BMC Genom.* 19: 599.
356. **Shan C., Zhang Y.** (2024) Poly-Glutamic Acid Regulates Physiological Characteristics, Plant Growth, and the Accumulation of the Main Medical Ingredients in the Root of *Salvia miltiorrhiza* Under Water Shortage. *Agronomy* 14: 2977.
357. **Sharma P., Dubey R.S.** (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 46: 209–221.
358. **Sharp R.E., Poroyko V., Hejlek L.G., Spollen W.G., Springer G.K., Bohnert H.J., Nguyen H.T.** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55: 2343–2351.
359. **Shen D., Kulikova O., Guhl K., Geurts R.** (2019) The *Medicago truncatula* nodule identity gene MtNOOT1 is required for coordinated apical-basal development of the root. *BMC Plant Biol.* 19: 571.
360. **Shi F., Xu Z., Cen P.** (2007) Microbial production of natural poly amino acid. *Sci. China Ser. B* 50: 291–303.
361. **Shi W., Yue X., Liang J., Wen L., Li J., Li N., Lu Y.** (2023) Poly-γ-glutamic acid enhances the wheat yield, water use efficiency and soil physicochemical properties of the arid area in the Northwest China. *Arch. Agron. Soil Sci.* 69: 2663–2676.

362. **Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319.
363. **Shih L., Wu P.J., Shieh C.J.** (2005) Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 40: 2827–2832.
364. **Shomali A., Das S., Arif N., Sarraf M., Zahra N., Yadav V., Alhashimi A., Chauhan J., Hasanuzzaman M.** (2022) Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants* 11: 3158.
365. **Shukla P.S., Shotton K., Norman E., Neily W., Critchley A.T., Prithiviraj B.** (2017) Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants* 10: plx051.
366. **Siddiqui N., Gabi M.T., Kamruzzaman M., Bhowmik A., Faraji M., Roy R., Al-Mamun M., El-Shehawi A.M., El-Tahan A.M., Ahmed S.** (2023) Genetic dissection of root architectural plasticity and identification of candidate loci in response to drought stress in bread wheat. *BMC Genom. Data* 24: 38.
367. **Silsbury J.** (1977) Energy requirement for symbiotic nitrogen fixation. *Nature* 267: 149–150.
368. **Silva T.S., Silva A.P.S., de Almeida Santos A., de Melo M.A.B., de Oliveira Santos J.I., de Camargo P.B., de Castro S.S.L., de Oliveira T.S.** (2020) Cytotoxicity, Genotoxicity, and Toxicity of Plant Biostimulants Produced in Brazil: Subsidies for Determining Environmental Risk to Non-Target Species. *Water Air Soil Pollut.* 231: 233.
369. **Skalski T., Zając E., Jędrszczyk E., Mazur P., Ryś M., Janeczko A., Oliwa J., Antonkiewicz J., Kołodziej B., Sękara A.** (2024) Effects of γ -polyglutamic acid on grassland sandy soil properties and plant functional traits exposed to drought stress. *Plant Soil Environ.* 70: 673–682.
370. **Sofi P.A., Rehman K., Gull M., Zargar S.M., Mir R.A., Sharma S., Shikari A.B., Shivasubramanian S.** (2021) Integrating root architecture and physiological approaches for improving drought tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol. Rep.* 26: 4–22.
371. **Spaepen S., Vanderleyden J.** (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a001438.
372. **Spaenk H., Wijffelman C., Pees E., Okker R.J., Lugtenberg B.J.** (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337–340.
373. **Speirs J., Binney A., Collins M., Edwards E., Loveys B.** (2013) Expression of ABA synthesis and metabolism genes under water deficit in grapevine. *J. Exp. Bot.* 64: 201–212.
374. **Sprent J.I.** (2009) Legume nodulation: A global perspective. Wiley-Blackwell.
375. **Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G.D.** (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 110–121.
376. **Steinberg C.E., Kamara S., Prokhotskaya V.Y., Manusadžianas L., Karasyova T.A., Timofeyev M.A., Jie Z., Paul A., Meinelt T., Farjalla V.F.** (2006) Dissolved

- humic substances—ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshw. Biol.* 51: 1189–1210.
377. **Stępkowski T., Hughes C.E., Law I.J., Markiewicz Ł., Gurda D., Chlebicka A., Moulin L.** (2007) Diversification of lupin *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3254–3264.
 378. **Studer C., Peterson C.A.** (1998) Root growth, cell division, and cell elongation in the root of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Exp. Bot.* 49: 775–788.
 379. **Sun D., Lei Z., Carriquí M., Zhang Y., Liu T., Wang S., Song K., Zhu L., Zhang W., Zhang Y.** (2025) Reductions in mesophyll conductance under drought stress are influenced by increases in cell wall chelator-soluble pectin content and denser microfibril alignment in cotton. *J. Exp. Bot.* 76: 1116–1130.
 380. **Sun J., Cardoza V., Mitchell D.M., Bright L., Oldroyd G., Harris J.M.** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.* 46: 961–970.
 381. **Sun Y., Robert C.A., Thakur M.P.** (2024) Drought intensity and duration effects on morphological root traits vary across trait type and plant functional groups: a meta-analysis. *BMC Ecol. Evo.* 24: 92.
 382. **Surabhi G.K., Reddy A., Sudhakar C.** (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.* 165: 1245–1251.
 383. **Surender-Reddy P., Jogeswar G., Rasineni G.K., Maheswari M., Reddy A.R., Varshney R.K., Kavi Kishor P.B.** (2015) Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol. Biochem.* 94: 104–113.
 384. **Suzuki A., Akune M., Kogiso M., Imagama Y., Osuki K., Uchiumi T., Higashi S., Han S.Y., Yoshida S., Asami T., Abe M.** (2004) Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol.* 45: 914–922.
 385. **Szabados L., Savaouré A.** (2010) Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: 89–97.
 386. **Szymańska-Chargot M., Chylińska M., Pieczywek P.M., Rösch P., Schmitt M., Popp J., Zdunek A.** (2016) Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence. *Planta* 243: 935–945.
 387. **Tang C., Robson A.D.** (1993) pH above 6.0 reduces nodulation in *Lupinus* species. *Plant Soil* 152: 269–276.
 388. **Tang H., Zhu H.** (2023) Specific Changes in Morphology and Dynamics of Plant Mitochondria under Abiotic Stress. *Horticulturae* 9: 11.
 389. **Tardieu F., Tuberosa R.** (2010) Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 206–212.
 390. **Tarui Y., Iida H., Ono E., Miki W., Hirasawa E., Fujita K., Tanaka T., Taniguchi M.** (2005) Biosynthesis of poly-γ-glutamic acid in plants: Transient expression of poly-γ-glutamate synthetase complex in tobacco leaves. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 443–448.

391. **Taylor I.B., Burbidge A., Thompson A.J.** (2000) Control of abscisic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* 51: 1563–1574.
392. **Teaster N.D., Keereetaweep J., Kilaru A., Wang Y.S., Tang Y., Tran C.N., Ayre B.G., Chapman K.D., Blancaflor E.B.** (2012) Overexpression of Fatty Acid Amide Hydrolase Induces Early Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 3: 32.
393. **Teaster N.D., Motes C.M., Tang Y., Wiant W.C., Cotter M.Q., Wang Y.S., Kilaru A., Venables B.J., Hasenstein K.H., Gonzalez G., Blancaflor E.B., Chapman K.D.** (2007) *N*-Acylethanolamine metabolism interacts with abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell* 19: 2454–2469.
394. **Tenhaken R.** (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 5: 771.
395. **Testerink C., Munnik T.** (2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 368–375.
396. **Testerink C., Munnik T.** (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62: 2349–2361.
397. **Thompson A.J., Jackson A.C., Parker R.A., Morpeth D.R., Burbidge A., Taylor I.B.** (2000) Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 42: 833–845.
398. **Tominaga A., Nagata M., Futsuki K., Abe H., Uchiumi T., Abe M., Kucho K., Hashiguchi M., Akashi R., Hirsch A.M., Arima S., Suzuki A.** (2009) Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant enhanced nitrogen fixation1 of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 151: 1965–1976.
399. **Trenberth K., Dai A., van der Schrier G., Jones P.D., Barichivich J., Briffa K.R., Sheffield J.** (2014) Global warming and changes in drought. *Nature Clim. Change* 4: 17–22.
400. **Tukaj Z., Pokora W.** (2006) Individual and Combined Effect of Anthracene, Cadmium, and Chloridazone on Growth and Activity of SOD Isoforms in Three *Scenedesmus* Species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 323–331.
401. **Ulvskov P., Wium H., Bruce D., Jørgensen B., Qvist K.B., Skjøl M., Hepworth D.M., Borkhardt B., Sørensen S.O.** (2005) Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes. *Planta* 220: 609–620.
402. **Upchurch R.G.** (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30: 967–977.
403. **Valenzuela C.E., Acevedo-Acevedo O., Miranda G.S., Vergara-Barros P., Holuigue L., Figueroa C.R., Figueroa P.M.** (2016) Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in *Arabidopsis* primary root. *J. Exp. Bot.* 67: 4209–4220.
404. **Van de Velde W., Guerra J.C.P., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S.** (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141: 711–720.

405. **Van Oosten M.J., Pepe O., De Pascale S., Silletti S., Maggio A.** (2017) The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4: 5.
406. **Verbeke S., Padilla-Díaz C.M., Haesaert G., Steppe K.** (2022) Osmotic Adjustment in Wheat (*Triticum aestivum* L.) During Pre- and Post-anthesis Drought. *Front. Plant Sci.* 13: 775652.
407. **Verbruggen N., Hermans C.** (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753–759
408. **Verma D.P.S., Hu C.A., Zhang M.** (1992) Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol. Plant.* 85: 253–265.
409. **Verma V., Ravindran P., Kumar P.P.** (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16: 86.
410. **Voiniciuc C., Pauly M., Usadel B.** (2018) Monitoring polysaccharide dynamics in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 176: 2590–2600.
411. **Waadt R., Seller C.A., Hsu P.K., Takahashi Y., Munemasa S., Schroeder J.I.** (2022) Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 680–694.
412. **Walton J.** (1979) Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1337–1342.
413. **Wang F., Liang J., Xiao W., Wang W., Fu D.** (2017) Improved production of poly- γ -glutamate by newly *Bacillus subtilis* 115. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 11: 159–168.
414. **Wang J., Hu T., Wang W., Hu H., Wei Q., Wei X., Bao C.** (2019a) Bioinformatics Analysis of the Lipoxygenase Gene Family in Radish (*Raphanus sativus*) and Functional Characterization in Response to Abiotic and Biotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 6095.
415. **Wang Q., Chen S., Kong J., Hao W., Li Y., Zhao L., Hu J., Zhang G., Xue Y., Xu X.** (2008) Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresour. Technol.* 99: 3318–3323.
416. **Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244–252.
417. **Wang W., Zheng W., Lv H., Liang B., Jin S., Li J., Zhou W.** (2022b) Animal-derived plant biostimulant alleviates drought stress by regulating photosynthesis, osmotic adjustment, and antioxidant systems in tomato plants. *Sci. Hortic.* 305: 111365.
418. **Wang W.B., Kim Y.H., Lee H.S., Kim K.Y., Deng X.P., Kwak S.S.** (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 570–577.
419. **Wang X., Dong G., Liu X., Zhang S., Li C., Lu X., Xia T.** (2020) Poly- γ -glutamic acid-producing bacteria reduced Cd uptake and effected the rhizosphere microbial communities of lettuce. *J. Hazard. Mater.* 398: 123146.

420. **Wang X., Liu H., Yu F., Hua Z., Yuan S.** (2019b) Differential activity of the antioxidant defence system and alterations in the accumulation of osmolyte and reactive oxygen species under drought stress and recovery in rice (*Oryza sativa* L.) tillering. *Sci. Rep.* 9: 8543.
421. **Wang Y., Guo Z., Zhang S., Li F., Han Y.** (2025a) Foliar Application of γ -Polyglutamic Acid Enhances Growth, Yield, and Rhizosphere Microbiota of Summer Maize Under Varied Water Regimes. *Agronomy* 15: 754.
422. **Wang Y., Mostafa S., Zeng W., Jin B.** (2021) Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 8568.
423. **Wang Z., Zhang X., Liusui Y., Fu W., Han A., Zhao D., Yue J., Tu Y., Zhang J., Guo Y.** (2025b) Unveiling the molecular mechanisms of γ -polyglutamic acid-mediated drought tolerance in cotton through transcriptomic and physiological analyses. *BMC Plant Biol.* 25: 392.
424. **Wani P.A., Khan M.S.** (2010) *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium-stressed soils. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3262–3267.
425. **Wasaya A., Zhang X., Fang Q., Yan Z.** (2018) Root Phenotyping for Drought Tolerance: A Review. *Agronomy* 8: 241.
426. **Wasternack C., Hause B.** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann. Bot.* 111: 1021–1058.
427. **Wasternack C., Strnad M.** (2016) Jasmonate signaling in plant stress responses and development - active and inactive compounds. *N. Biotechnol.* 33: 604–613.
428. **Weng J.H.** (2006) Underestimate of PS2 efficiency in the field due to high leaf temperature resulting from leaf clipping and its amendment. *Photosynthetica* 44: 467–470.
429. **Wheeler T., Von Braun J.** (2013) Climate change impacts on global food security. *Science* 341: 508–513.
430. **Wiatr K., Dolata A.** (2008) W strączkowych drzewie potencjał. *Top Agrar Pol.* 3: 134–137.
431. **Willats W.G.T., McCartney L., Knox J.P.** (2001) In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 213: 37–44.
432. **Wilmowicz E., Kućko A., Alché J.D.D., Czeszewska-Rosiak G., Florkiewicz A.B., Kapusta M., Karwaszewski J.** (2022) Remodeling of cell wall components in root nodules and flower abscission zone under drought in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 1680.
433. **Wilmowicz E., Kućko A., Burchardt S., Przywieczerski K.** (2019) Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3705.
434. **Wilmowicz E., Kućko A., Golińska P., Burchardt S., Przywieczerski T., Świdziński M., Brzozowska P., Kapuścińska D.** (2020) Absciscic acid and ethylene in the control of nodule-specific response on drought in yellow lupine. *Environ. Exp. Bot.* 169: 103900.

435. **Wolf S., Greiner S.** (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249: 169–175.
436. **Wolf S., Mouille G., Pelloux J.** (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* 2: 851–860.
437. **Wolkaro T., Tesfaye G.** (2025) Role of Forage Legumes in Enhancing Soil Fertility and Livestock Nutrition in Ethiopia. *Am. J. Appl. Sci. Res.* 11: 145–151.
438. **Wu G., Tian Q., Reed J.W.** (2012) *Arabidopsis* BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously unidentified pathway downstream of LEAFY and UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Plant J.* 71: 161–175.
439. **Wu J., Zhu M., Liu W., Jahan M.S., Gu Q., Shu S., Sun J., Guo S.** (2022) *CsPAO2* Improves Salt Tolerance of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) through the Interaction with *CsPSA3* by Affecting Photosynthesis and Polyamine Conversion. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 12413.
440. **Wu L., Zhang Q., Lu N.** (2024) Poly-glutamic acid reinforces wheat cadmium tolerance by modulating ascorbic acid and glutathione metabolism. *Plant Soil Environ.* 70: 483–491.
441. **Wu Y., Cosgrove D.J.** (2000) Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.* 51: 1543–1553.
442. **Wu Z., Liu M., Wang H., Li M., Liu X., Zang Z., Jiang L.** (2025) *ZmCam2-1*, a Calmodulin Gene, Negatively Regulates Drought Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* Through the ABA-Independent Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 26: 2156.
443. **Xiao C., Somerville C., Anderson C.T.** (2014) POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 1018–1035.
444. **Xiao N., Ma H., Wang W., Sun Z., Li P., Xia T.** (2024) Overexpression of *ZmSUS1* increased drought resistance of maize (*Zea mays* L.) by regulating sucrose metabolism and soluble sugar content. *Planta* 259: 43.
445. **Xu C., Mou B.** (2018) Chitosan as Soil Amendment Affects Lettuce Growth, Photochemical Efficiency, and Gas Exchange. *HortTechnology* 28: 476–480.
446. **Xu Y., Qian X., Li K., Zhou T., Tian Y., Yuan L., Wang Z., Yang J.** (2023) Differential roles of abscisic acid in maize roots in the adaptation to soil drought. *Food Energy Secur.* 12: e458.
447. **Xu Z., Lei P., Pang X., Li H., Feng X., Xu H.** (2017) Exogenous application of poly-γ-glutamic acid enhances stress defense in *Brassica napus* L. seedlings by inducing cross-talks between Ca^{2+} , H_2O_2 , brassinolide, and jasmonic acid in leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 118: 460–470.
448. **Xu Z., Ma J., Lei P., Feng X., Xu Z., Zhan J., Xu H.** (2020) Poly-γ-glutamic acid induces system tolerance to drought stress by promoting abscisic acid accumulation in *Brassica napus* L. *Sci. Rep.* 10: 252.
449. **Xu Z., Wan C., Xu X., Feng X., Xu H.** (2013) Effect of poly (γ-glutamic acid) on wheat productivity, nitrogen use efficiency and soil microbes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13: 744–755.

450. **Xu Z., Zhang Z., Feng X., Wan C., Xu X., Xu H.** (2014) Calcium involved in the poly(γ -glutamic acid)-mediated promotion of Chinese cabbage nitrogen metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 80: 144–152.
451. **Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Yoshida Y.** (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.* 56: 1975–1981.
452. **Yang Q., Yang Y., Li X.T., Xu Z., Peng H.L., Wang J.** (2024) γ -Polyglutamic acid enhances growth by facilitating micronutrients and mitigating cadmium in pepper. *SSRN*: 5800822.
453. **Yeremko L., Czopek K., Staniak M., Marenych M., Hanhur V.** (2025) Role of Environmental Factors in Legume-*Rhizobium* Symbiosis: A Review. *Biomolecules* 15: 118.
454. **Yin A., Jia Y., Qiu T., Gao M., Cheng S., Wang X., Sun Y.** (2018) Poly- γ -Glutamic Acid Improves the Drought Resistance of Maize Seedlings by Adjusting the Soil Moisture and Microbial Community Structure. *Appl. Soil Ecol.* 129: 128–135.
455. **Yu Q., Liu Y.L., Sun G.Z., Liu Y.X., Chen J., Zhou Y.B., Chen M., Ma Y.Z., Xu Z.S., Lan J.H.** (2021) Genome-Wide Analysis of the Soybean Calmodulin-Binding Protein 60 Family and Identification of *GmCBP60A-1* Responses to Drought and Salt Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 13501.
456. **Yuan Y., Dickinson N.** (2024) Revealing the complex interplay of biostimulant applications. *Plants* 13: 2188.
457. **Zafar M.M., Chattha W.S., Khan A.I., Zafar S., Subhan M., Saleem H., Ali A., Ijaz A., Anwar Z., Qiao F., Shakeel A.** (2023) Drought and heat stress on cotton genotypes suggested agro-physiological and biochemical features for climate resilience. *Front. Plant Sci.* 14: 1265700.
458. **Zaliwski A.S., Górski T., Kozyra J.** (2012) Podatność rolnictwa Polski na suszę. *Stud. Rap. IUNG-PIB* 29: 105–118.
459. **Zanuy D., Aleman C.** (2001) Poly (γ -glutamic acid) in aqueous solution: molecular dynamics simulations of 10- and 20-residue chains at different temperatures. *Biomacromolecules* 2: 651–657.
460. **Zegada-Lizarazu W., Monti A.** (2019) Deep root growth, ABA adjustments and root water uptake response to soil water deficit in giant reed. *Ann. Bot.* 124: 605–15.
461. **Zhai Z., Shi W., Pang L., He Z., Li J., Wen L.** (2024) Effects of Poly- γ -Glutamic Acid on Soil Pore Structure, Maize Grain Filling, Yield and Water Use Efficiency under Mulched Drip Irrigation. *Field Crops Res.* 317: 109528.
462. **Zhang L., Yang X., Gao D., Wang L., Li J., Wei Z., Jiao J., Yin H., Chu W.** (2017) Effects of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plant-soil system. *Sci. Rep.* 7: 6090.
463. **Zhang M., Chavan R.R., Smith B.G., Harris P.J.** (2016) Tracheid cell-wall structures and locations of (1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-galactans and (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in compression woods of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don). *BMC Plant Biol.* 16: 194.
464. **Zhang Q., Zhao Y., Zhang J., Li X., Ma F., Duan M., Zhang B., Li H.** (2021) The Responses of the Lipoxygenase Gene Family to Salt and Drought Stress in Foxtail Millet (*Setaria italica*). *Life* 11: 1169.

465. **Zhang Y., Bao C., Shen L., Tian C., Zang X., Chen G., Zhang S.** (2022) Microbial Cold Shock Proteins: Overview of their Function and Mechanism of Action. *Protein Pept. Lett.* 29: 133–142.
466. **Zhang Z., Wang Y., Chang L., Zhang T., An J., Liu Y., Cao Y., Zhao X., Sha X., Hu T.** (2016) *MsZEP*, a novel zeaxanthin epoxidase gene from alfalfa (*Medicago sativa*), confers drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 35: 339–353.
467. **Zhu J.K.** (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167: 313–324.
468. **Zhu Q., Li Y., Zhang N., Wu Y., Ou X.** (2024) Poly-glutamic acid mitigates the negative effects of salt stress on wheat seedlings by regulating the photosynthetic performance, water physiology, antioxidant metabolism and ion homeostasis. *Plant Soil Environ.* 70: 454–467.
469. **Zupin M., Sedlar A., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J.** (2017) Drought-induced expression of aquaporin genes in leaves of two common bean cultivars differing in tolerance to drought stress. *J. Plant Res.* 130: 735–745.