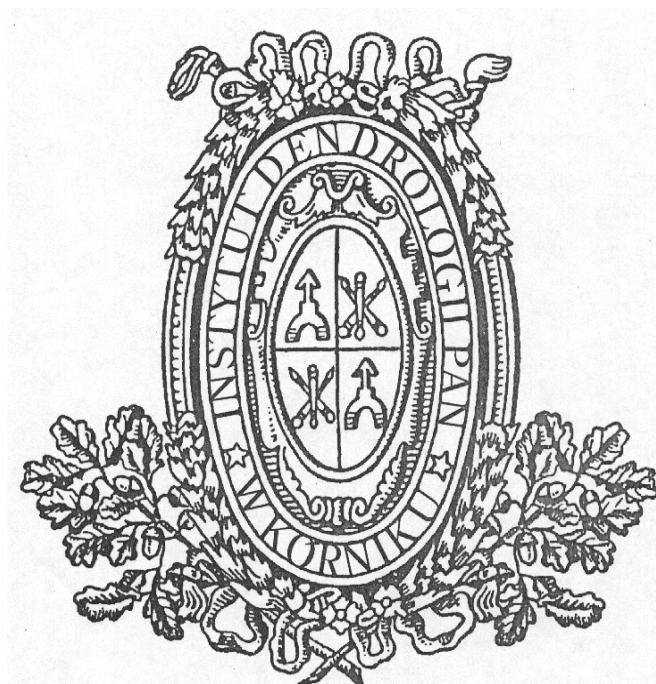


Instytut Dendrologii  
Polskiej Akademii Nauk

## **SPRAWOZDANIE**

z działalności w 2009 roku



## Spis treści

tytuł		strona
1	Podstawowe dane	3
2	Struktura organizacyjna	4
3	Publikacje	5
	3.1. z listy filadelfijskiej	5
	3.2. w publikatorach polskich	9
	3.3. Autorstwo rozdziałów w monografiach lub podręcznikach	10
4	Projekty badawcze	11
	4.1. działalności statutowej	11
	4.2. własne	26
	4.3. promotorskie	34
	4.4. międzynarodowe	36
	4.5. zlecone przez resorty	36
	4.6. finansowane przez podmioty zagraniczne	40
	4.7. Badania wykonane w ramach sieci	41
5	Ważniejsze wyniki badań	44
6	Uzyskane patenty	45
7	Kształcenie kadr naukowych	46
8	Działalność wydawnicza	48
11	Wykłady i referaty wygłoszone na konferencjach i na zaproszenie	49
12	Współpraca z zagranicą	54
13	Działalność dydaktyczna	56
14	Organizacja konferencji	57
15	Działalność zaplecza naukowego: Biblioteki, Arboretum i Laboratorium Analiz Mineralnych	58
16	Nagrody	60
17	Centra Doskonałości, sieci i konsorcja	61
18	Zatrudnienie	62

## Struktura organizacyjna Instytutu

lp	Nazwa pracowni / działu	Kierownik
	<b>Pracownie naukowe</b>	
1	Pracownia Badania Mikoryz	prof. dr hab. Maria Rudawska
2	Pracownia Biochemii Nasion	prof. dr hab. Stanisława Pukacka
3	Pracownia Bioindykacji	prof. dr hab. Piotr Karolewski
4	Pracownia Biologii Molekularnej	prof. dr hab. Andrzej Lewandowski
5	Pracownia Biologii Nasion	doc. dr hab. Tadeusz Tylkowski
6	Pracownia Ekofizjologii	prof. dr hab. Jacek Oleksyn
7	Pracownia Fizjologii Stresów Abiotycznych	prof. dr hab. Paweł Pukacki
8	Pracownia Genetyki Biochemicznej	prof. dr hab. Leon Mejnartowicz
9	Pracownia Genetyki Populacyjnej	prof. dr hab. Władysław Chałupka
10	Pracownia Patologii Systemu Korzeniowego	dr Marcin Zadworny
11	Pracownia Proteomiki	prof. dr hab. Gabriela Lorenc-Plucińska
12	Pracownia Rozmnażania Wegetatywnego	prof. dr hab. Krystyna Bojarczuk
13	Pracownia Systematyki i Geografii	doc. dr hab. Krystyna Boratyńska
	<b>Działy pomocnicze</b>	
1	Arboretum	mgr Kinga Nowak-Dyjeta
2	Biblioteka i Archiwum	mgr Małgorzata Kosińska mgr Izabela Żabińska
3	Laboratorium Analiz Mineralnych (od 1.10.)	mgr Ewa Mąderek
	<b>Administracja i Księgowość</b>	

1	Dział Administracyjny	inż. Witold Jakubowski
2	Dział Finansowo-Księgowy	mgr Iwona Mośkowiak

## Opis realizacji badań statutowych i uzyskane wyniki

### Temat 1. Genetyczno-środowiskowe podstawy funkcjonowania i zachowania zasobów genowych drzew i krzewów

koordynator: J. Oleksyn

Zadanie 1. Wpływ czynników abiotycznych i biotycznych na funkcjonowanie roślin drzewiastych i ich zbiorowisk

Wykonywali: M.J. Giertych, A.M. Jagodziński, P. Karolewski, E. Mąderek (do 30.09), J. Mucha, A. Napierała-Filipiak, J. Oleksyn, M. Zadworny, R. Żytkowiak, L. Bładocha (od 1.06.), A. Bukowska, A. Nowak (od 1.10.)

Badano wpływ defoliacji symulującej zgryzienia przez foliofagi (usunięto 50% liczby liści) oraz warunków świetlnych wzrostu siewek pięciu gatunków krzewów podszytowych (100 i 15% naturalnego oświetlenia), na witalność (% żywych korzeni) i metabolizm drobnych korzeni (<2 mm). Dwa gatunki (*Sambucus nigra* i *Cornus sanguinea*) należą do bardziej światłoządnych i jednocześnie mniej zgryzanych przez foliofagi, w porównaniu do trzech pozostałych (*Prunus serotina*, *Frangula alnus* i *Corylus avellana*). Defoliacja (D) spowodowała statystycznie istotne obniżenie witalności drobnych korzeni o 15% (średnio dla wszystkich gatunków). Analizując gatunki (S) oddzielnie, istotny negatywny wpływ defoliacji na witalność korzeni odnotowano tylko u tych gatunków, których liście są mniej zgryzane w naturze tj. *S. nigra* (o 48% w stosunku do niedefoliowanych siewek) i *C. sanguinea* (o 5%).

Redukcja światła (L) spowodowała także zmniejszenie witalności korzeni (średnio u wszystkich gatunków o 18%). Dlatego też większy (o 22%) wpływ defoliacji na spadek witalności korzeni stwierdzono u siewek rosnących w zredukowanym niż w pełnym oświetleniu. Witalność korzeni (dla wszystkich wariantów: S, L, D) korelowała istotnie, dodatnio z ich suchą masą, sumaryczną zawartością rozpuszczalnych fenoli (SF) i stosunkiem zawartości węgla do azotu (C/N), a ujemnie z zawartością w nich azotu i cukrów niestrukturalnych (TNC), w tym cukrów rozpuszczalnych (CR) i skrobi.

Wyniki wskazują, że większa witalność korzeni defoliowanych siewek związana była bardziej z wysokim poziomem w nich związków obronnych (SF i tanin), niż z niską zawartością w nich N i TNC. Istotnie wyższe poziomy SF i tanin na skutek defoliacji stwierdzono w porównaniach międzygatunkowych. Analizując każdy gatunek oddzielnie, wpływ defoliacji na wzrost poziomu związków obronnych wykazano tylko w przypadku SF, u dwóch gatunków reprezentujących różne grupy pod względem światłoządności i stopnia zgryzienia przez foliofagi (*C. sanguinea* i *P. serotina*). Istotnie wyższą zawartością SF i tanin, charakteryzowały się siewki rosnące w 15% oświetleniu.

Generalnie, nasze wyniki wykazały, że większą witalnością korzeni charakteryzują się te gatunki, których liście są silniej zgryzane przez foliofagi w warunkach naturalnych. U tych gatunków najbardziej prawdopodobną przyczyną większej witalności korzeni jest zwiększenie w nich poziomu SF i tanin. Jest to bardziej wyraźne przy zredukowanym

świecie, a więc w takich warunkach, w których zgryzanie liści przez owady w naturze jest intensywniejsze.

## Zadanie 2. Bioróżnorodność, taksonomia i ekologia roślin drzewiastych środkowej Europy i Śródziemnomorza

Wykonywali: K. Boratyńska, A. Boratyński, M. Filipiak, G. Iszkuło, P. Kosiński,  
D. Tomaszewski, D. Kuberacka (do 30.11.)

Rozpoczęto badania nad zmiennością liści metodą punktów charakterystycznych rozmieszczonych na brzegu liścia. Poddano im blaszkę liściową olszy szarej (*Alnus incana*) z 22 populacji (10 z terenu Polski, 3 z Finlandii, 3 z Norwegii, 2 z Francji, 2 z Ukrainy, 1 z Austrii i 1 z Bułgarii). Zastosowano metodę analizy kształtu przy pomocy 50 punktów. Przeanalizowano łącznie 6527 liści z 658 osobników, uzyskując ponad 650 tys. danych, które poddano obróbce statystycznej metodą analizy składowych głównych. Analiza wykazała istnienie różnic między populacjami, lecz nie były one silnie zaznaczone i zakresy zmienności znacząco się pokrywały. Możliwe było jednak wyodrębnienie kilku grup populacji zbliżonych do siebie pod względem dwóch głównych składowych (łącznie tłumaczących ok. 90% zmienności). Najsilniej wyodrębniały się: 1) populacja z Austrii, 2) fińska populacja z okolic Oulu oraz 3) grupa populacji norweskich wraz z najdalej na północ wysuniętą populacją z Finlandii. Poza tymi przypadkami nie stwierdzono wyraźnego związku między położeniem geograficznym a najważniejszymi elementami odpowiedzialnymi za kształt. Jednocześnie wykazano, jakie elementy są odpowiedzialne w głównej mierze za zmienność blaszki liściowej. Są to wielkość (ok. 80%) oraz wyciągnięcie/szerokość (blisko 10%). Asymetria liścia w niewielkim stopniu decyduje o zmienności kształtu liścia u tego gatunku.

W roku 2009 zakończono, we współpracy z Instytutem Botaniki NANU w Kijowie, studium porównawcze nad igłami i szyszkami *Pinus* sp. z torfowiska Mszana w Gorganach (Ukraina). Sosna ta została niedawno znaleziona i na podstawie drzewkowatego pokroju wstępnie oznaczona jako *Pinus uliginosa*. Byłoby to najdalej na wschód wysunięte stanowisko tego interesującego gatunku. Z tego względu oraz z uwagi na izolowany charakter stanowiska i nietypowe dla *P. uliginosa* szyszki, na torfowisku zebrano niezbędny materiał do analiz. Na podstawie analiz biometrycznych wykazano, że populacja ta pod względem cech igieł jest zbliżona do *P. uliginosa* z Sudetów i Borów Dolnośląskich, jednak w cechach szyszek bardziej przypomina *P. mugo*. Populacja jest położona w obrębie znacznie liczniejszej populacji typowej kosodrzewiny, co zapewne przyczyniło się do erozji genetycznej *P. uliginosa*, tym niemniej opisywane stanowisko może być traktowane jako ślad migracji tego gatunku. Wyniki przesłano do druku.

Opracowano wyniki 11-letnich obserwacji występowania trzy- lub więcej-igłowych brachyblastów na *Pinus mugo* w Karkonoszach i Tatrach. Wykazano wpływ warunków termicznych lata roku poprzedniego i późnej jesieni oraz wczesnej zimy 2 lata przed wyrastaniem igieł z pąków na udział nietypowych krótkopędów przyrostów rocznych.

Kontynuowano badania wpływu warunków środowiskowych na strukturę płciową i właściwości przyrostowe drzew dwupiennych. Wykazano, że osobniki męskie *Juniperus communis* miały istotnie większe przyrosty począwszy od 9 roku życia. Mimo, że od 17 roku różnice między osobnikami różnych płci wyraźnie były mniejsze, jednak były istotne

statystycznie. Prawdopodobnie jest to związane z osiągnięciem dojrzałości płciowej. Wykazano istotny pozytywny wpływ temperatur grudnia roku poprzedzającego kształtowanie przyrostu rocznego na grubość i marca roku bieżącego na szerokość słoja rocznego u osobników męskich oraz lutego, marca i sierpnia u osobników żeńskich. Spośród warunków hydrologicznych - jedynie opady lipca roku bieżącego wpłynęły pozytywnie na szerokość słoja rocznego u osobników męskich. Osobniki żeńskie zareagowały zwiększeniem przyrostu rocznego na opady lutego i lipca.

Analizowano wyniki kontrolowanych wysiewów nasion jodły wykonanych na siedlisku boru mieszanego górskiego, odpowiadającym zespołowi roślinnemu *Abieti-Piceetum montanum* w warunkach różnego zwarcia drzewostanu. Poziom wschodów i przeżywalność siewek wyraźnie (nawet o ok. 80%) spada na stanowiskach o większej dostępności światła, ale także, chociaż w mniejszym stopniu (ok. 20 %), w warunkach pełnego zwarcia koron świerka, którego okap może ograniczać wilgotność wierzchnich warstw gleby. Najwięcej siewek wschodzi w warunkach 18% oświetlenia pełnego, a najwięcej przeżywa pierwszych 5 lat przy poziomie oświetlenia 25%. Niedobór opadów w okresie kwiecień-maj może ograniczyć wschody nasion wysianych jesienią o ok. 70% a nasion wysianych wiosną nawet o 90%. W typowych warunkach wysiew wiosenny jest nieznacznie efektywniejszy niż zbliżony do naturalnego siew jesienny. W przypadku systematycznego dostarczania wody (namioty cieniujące, podłoże naturalne przywiezione z powierzchni doświadczalnych) poziom wschodów wzrasta czterokrotnie (przeciętnie z 13 do 57%). Usunięcie wierzchniej warstwy ściółki zwiększa przeciętnie wschody o 58% a przeżywalność o 22%. O wzroście siewek decyduje przede wszystkim światło. Najszybciej przyrastają siewki, które przeżyły pierwsze dwa lata w warunkach 70-80% pełnego oświetlenia. W wieku 6 lat są one przeciętnie pięciokrotnie wyższe i ponad dwudziestokrotnie cięższe niż siewki rosnące w warunkach 5-8% ocienienia. W przypadku badanych powierzchni ogrodzenie miejsc wysiewu (ochrona przed zwierzyną) ograniczyło śmiertelność siewek mniej więcej o 15%.

### Zadanie 3. Zróżnicowanie genetyczne roślin drzewiastych na różnych poziomach zmienności w interakcji ze środowiskiem

Wykonywali: W. Chałupka, M. Guzicka, L. Mejnartowicz, D.J. Chmura (staż doktorski w USA), J. Bąkowska, H. Przybył, J. Kozłowska, R. Rożkowski, A. Misiorny

Przedmiotem badań było potomstwo modrzewia europejskiego z kontrolowanych krzyżówek, wykonanych w różnych systemach kojarzenia (dialleliczny niepełny, mieszanina pyłków i wolne zapylenie). Krzyżówki między ośmiu klonami na plantacji nasiennej wykonał dr Grzegorz Kosiński w 1979 r., a następnie z otrzymanych nasion wyhodował siewki i założył w 1984 roku rodową powierzchnię doświadczalną pokolenia F<sub>1</sub>. Klony wybrane do krzyżowań pochodziły z drzew matecznych (doborowych) zlokalizowanych w odległych od siebie nadleśnictwach (Kartuzy na Pomorzu Gdańskim, Łopuchówko w Wielkopolsce, Bliżyn w Górach Świętokrzyskich oraz Szczytna w Sudetach). Na powierzchni tej do 2009 roku pozostało potomstwo 35 rodów, co stanowi 64,8% wyjściowej ich liczby. Najwyższą przeżywalność odnotowano w grupie rodów pochodzących z wolnego zapylenia - 70,6 %. W dalszej kolejności znalazły się warianty mieszanin pyłku z trzech, czterech lub ośmiu klonów ojcowskich, odpowiednio: 50,0%, 37,5 %, 37,5% oraz wariant częściowo dialleliczny (zapylenie pyłkiem pojedynczych klonów ojcowskich): 34,9 %.

Powyższe dane wskazują, iż w programach hodowlanych obejmujących duże liczby osobników (np. testowanie klonów na plantacjach nasiennych), wystarczające mogą być testy potomstwa uzyskanego w wyniku wolnego zapylania. Tym samym możliwe jest uniknięcie stosowania pracochłonnej i kosztownej metody kontrolowanego zapylania.

Poza przeżywalnością opracowano w 2009 roku wyniki pomiarów średnicy pni na wysokości 1,3 m oraz oszacowano wskaźnikowo cechę prostości pnia. Przeciętna dla wszystkich rodów średnica 29-letnich modrzewi wyniosła 19,5 cm (8,5 – 25,2 cm). Analiza wariancji dla tej cechy wykazała istotne statystycznie zróżnicowanie rodów ( $p = 0,0449$ ), a test Tukey'a ( $p = 0,05$ ) ujawnił dwie grupy: pierwsza składała się z 34 rodów o średniej pierśnicy w zakresie od 12,4 cm do 25,2 cm, natomiast do drugiej grupy zaliczał się tylko jeden o najniższej średnicy pni – 8,5 cm. Odziedziczalność rodowa ( $h^2_R$ ) dla cechy średnicy była niska i osiągnęła wartość 0,410. Znacznie wyższą wartość osiągnęła natomiast odziedziczalność indywidualna:  $h^2_S = 0,898$ .

Cechę prostotę pnia szacowano w jednostkach względnych, w skali od 1 – pnie silnie krzywe, do 5 – pnie proste. Średni wskaźnik tej cechy dla wszystkich rodów dla doświadczenia wyniosła 2,9 (1,8 – 4,0), a różnice między rodami były statystycznie nieistotne ( $p = 0,3338$ ). Dodatkowe analizy wariancji wykazały, że zastosowane w krzyżowaniach systemy kojarzenia nie miały żadnego wpływu na wartość średnicy drzew ( $p = 0,952$ ) i ich prostotę ( $p = 0,491$ ).

Badania rozwoju systemu naczyniowego w obrębie zawiązków pędów oraz różnicowania się prokambium podczas wiosennej aktywacji pąków prowadzono na szczepach klonu świerka pospolitego (sygn. 04-118 pochodzenie Nadleśnictwo Serwy), rosnącego na modelowej plantacji nasiennej typu „outbreeding” w lesie doświadczalnym ID PAN. Rozwój systemu naczyniowego analizowano w oparciu o centralne przekroje podłużne przez zawiązki pędów kolekcjonowany w kolejnych tygodniach od grudnia do maja.

Zimą na centralnych przekrojach podłużnych przez zawiązki pędów widoczne były pasma komórek prokambialnych (3-5 rzędów komórek), w których różnicowały się pierwotne wiązki naczyniowe otaczające rdzeń. W tym czasie w zawiązkach pędów nie stwierdzono pochodnych komórek prokambialnych (cewek i komórek sitowych). Dobrze wykształcone pasma prokambium widoczne były w osiowej części zawiązka, nie były natomiast obecne w najmłodszych zawiązkach igieł. Ultrastruktura komórek prokambium zmieniała się w kolejnych tygodniach prowadzenia obserwacji, a zmiany te były szczególnie widoczne w plastydach (obecność lub brak skrobi; w odróżnieniu od innych rejonów zawiązka pędu na żadnym etapie nie obserwowano chloroplastów w komórkach prokambium).

Aktywność podziałowa komórek prokambium została podjęta około połowy marca i była poprzedzona przygotowawczą fazą wysokiej akumulacji skrobi. Na początku kwietnia pojawiły się pierwsze komórki protofloemu (około 0,1 mm poniżej wierzchołka), a nieco niżej - cewki protoksylemu (krótkie, z dość gęstymi spiralnymi zgrubieniami w ścianach). Również dojrzałe cewki metaksylemu charakteryzowała obecność zgrubień spiralnych (w zimowych pąkach świerka nie stwierdzono obecności elementów drewna wtórnego).

Kontynuowano również badania dotyczące ultrastrukturalnych przemian zawiązków pędów świerka podczas spoczynku i przeanalizowano elektronogramy dokumentujące zmiany ultrastruktury zawiązków igieł.

#### Zadanie 4. Zróznicowanie zbiorowisk mikoryzowych drzew leśnych w różnych warunkach ekologicznych

Wykonywali: M. Rudawska, T. Leski, L. Karliński, B. Kieliszewska-Rokicka,  
H. Narożna, M. Wójkiewicz, M. Łuczak

Badania prowadzone dla określenia jakościowej i ilościowej struktury grzybów mikoryzowych (GM) związanych z bukiem są kolejnym krokiem, który ma prowadzić do uzupełnienia i wzbogacenia naszej wiedzy na temat związków między grzybami mikoryzowymi a sadzonkami drzew leśnych w warunkach szkółki leśnej. Celem tych badań jest również znalezienie związku między zbiorowiskiem GM a warunkami glebowymi przy użyciu kanonicznej analizy korespondencji oraz porównanie poszczególnych szkółek ze sobą dzięki analizie podobieństw ANOSIM.

Na potrzeby badań jesienią 2008 roku wytypowano szkółki leśne, z których pobrano materiał (we wrześniu i październiku) w postaci dwuletnich sadzonek buka zwyczajnego. Wybrano następujące szkółki: Miranowo (Nadleśnictwo Piaski; RDLP Poznań), Prudnik (Nadleśnictwo Prudniki; RDLP Wrocław), Białe Błota (Nadleśnictwo Susz; RDLP Olsztyn) oraz Runowo (Nadleśnictwo Runowo; RDLP Toruń). W każdej z tych szkółek produkcja materiału sadzeniowego odbywa się na kwaterach o powierzchni ok. 1 ha, oddzielonych od siebie pasami starodrzewia. Z każdej szkółki pobrano 5 prób, z których każda składała się z 5 sadzonek buka.

Przeprowadzone prace laboratoryjne obejmujące dokumentację fotograficzną, analizę morfologiczną (morfotypowanie), analizę ilościową (obfitość występowania) morfotypów oraz ich identyfikację molekularną pozwoliły na wyróżnienie 22 taksonów. Spośród nich 14 zidentyfikowano do gatunku (*Cenococcum geophilum*, *Geopore cervina*, *Hebeloma cavipes*, *H. crustuliniforme*, *H. sacchariolens*, *H. vesterholtii*, *Hydnotrya tulasnei*, *Hymenogaster australis*, *Laccaria tortilis*, *Rhizoscyphus ericae*, *Scleroderma areolatum*, *S. verrucosum*, *S. citrinum*, *S. laeve*, *Tuber maculatum*), a 8 do rodzaju (*Alnicola sp.*, *Cadophora sp.*, *Lactarius sp.*, *Peziza sp.*, *Tomentella sp.1*, *Tomentella sp.2*, *Tuber sp.1*, *Tuber sp.2*). Z grupy 8 nierozpoznanych morfotypów dwa nie wykazują bliższego podobieństwa do sekwencji umieszczonych w bazach danych (Uncultured *Ascomycota* oraz Uncultured fungus), dla pozostałych 6, z powodu uzyskania nieczytelnych sekwencji, analizy molekularne są powtarzane.

Kolejnym krokiem w prowadzonych badaniach będzie zestawienie danych liczbowych z wynikami analiz glebowych (sporządzonych dla każdej próby korzeniowej) oraz analiza statystyczna wyników.

Badano także ektomikoryzy młodych osobników brzozy *Betula pendula* rosnących na terenie należącym do Huty Miedzi Głogów, w odległości ok. 1 km od źródeł emisji. Gleba, z której pobierane były próby korzeniowe brzozy zawierała wysokie stężenia miedzi i ołowiu (Cu: 2500 - 3700 mg kg<sup>-1</sup> s.m., Pb: 1500 - 1800 mg kg<sup>-1</sup> s.m.). Badane osobniki były w wieku 5-10 lat i pochodziły z naturalnej sukcesji. Celem badań było stwierdzenie zróznicowania zbiorowiska ektomikoryz drzew rosnących na glebach silnie zanieczyszczonych miedzią i ołowiem oraz wskazanie dominujących symbiontów grzybowych. Próby korzeniowe pobierano z warstwy 0-20 cm. Ektomikoryzy dzielono na morfotypy na podstawie cech zewnętrznych, a wybrane próby, reprezentujące najczęściej występujące morfotypy, poddawano analizie molekularnej. Stwierdzono, że korzenie

drobne brzozy były całkowicie skolonizowane przez grzyby ektomikoryzowe. Zróżnicowanie ektomikoryz było stosunkowo niskie. Dominowały morfotypy zidentyfikowane jako *Tomentella sp.*, *Lactarius sp.*, i niezidentyfikowany grzyb z rodziny *Thelephoraceae*. Obecne były również *Cenococcum geophilum* i *Phialophora sp.*

## Temat 2. Molekularne, fizjologiczne i biotechnologiczne podstawy reprodukcyjności drzew i krzewów

koordynator: S. Pukacka

### Zadanie 1. Mechanizmy reprodukcyjności nasion drzew i krzewów podczas ich dojrzewania, przechowywania i kiełkowania

Wykonywali: S. Pukacka, E. Kalemba, E. Ratajczak, T. Tylkowski, B. Bujarska-Borkowska, P. Chmielarz, T. Pawłowski, J. Suszka, K. Krawiarz D. Ratajczak

W roku sprawozdawczym badano wpływ jonów  $Se^{+4}$  na przeżywalność nasion *recalcitrant* (wrażliwych na podsuszanie) klonu srebrzystego (*Acer saccharinum*) podczas odwadniania. Nasiona po zbiorze wydobywano z owocni i część z nich moczone przez 6 godz. w roztworze seleninu sodu ( $Na_2SeO_3$ ) (10 mg/L), a druga część była moczone przez taki sam czas w wodzie. Po tym czasie nasiona moczone w Se opłukano dokładnie pod bieżącą wodą, po czym obie partie nasion ( $Se^+$  i  $Se^-$ ) wysuszono powierzchniowo w papierowym ręczniku i wyłożono do podsuszania w temperaturze pokojowej (20-22°C) i 45-50% RH. Przed podsuszaniem i w jego trakcie badano: zawartość wody, zdolność kiełkowania, wpływ elektrolitu, poziom aldehydu malonowego (MDA) oraz aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) i reduktazy glutationowej (GR) w nasionach  $Se^+$  i  $Se^-$ . Do 35% wody (48 godz. podsuszania) szybkość utraty wody dla obu partii nasion była jednakowa. Później zauważono wyraźnie niższe tempo odwadniania w nasionach  $Se^+$ , np. 30% wody nasiona  $Se^+$  osiągnęły po 72 h a nasiona  $Se^-$  po 60 h, i tak do końca doświadczenia. Zdolność kiełkowania nasion w zakresie wilgotności 40-30% była znacząco wyższa dla nasion traktowanych  $Se^+$ . Równocześnie wpływ elektrolitu z nasion na wszystkich etapach podsuszania był istotnie niższy dla nasion  $Se^+$ . Znacznie niższy był też w tych nasionach poziom MDA, co świadczy o mniej aktywnym procesie peroksydacji lipidów prowadzącym do uszkodzenia błon cytoplazmatycznych w komórkach nasion  $Se^+$ . Aktywność GPX, enzymu, który usuwa rodniki lipidowe i zapobiega lawinowej reakcji peroksydacji, była znacznie wyższa w osiach zarodkowych nasion  $Se^+$  w stosunku do nasion nietraktowanych, bezpośrednio po moczeniu i w dwóch pierwszych etapach podsuszania. Później różnice zanikały. W liścieniach w ogóle nie było różnic w aktywności tego enzymu pomiędzy nasionami  $Se^+$  i  $Se^-$ . W osiach zarodkowych nasion  $Se^+$  stwierdzono także interesujący wzrost aktywności GR, który wystąpił z pewnym opóźnieniem do GPX, dopiero w 3 i 4 terminie podsuszania. Uzyskane wyniki dają następujące informacje:

1. jony  $Se^{+4}$  zwiększają odporność na desykcję nasion klonu srebrzystego poprzez opóźnienie procesu degradacji błon podczas podsuszania.
2. powodują one zwiększenie aktywności GPX, która jest ważnym enzymem ochraniającym błony cytoplazmatyczne komórek przed destrukcją na skutek peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych.
3. w nasionach  $Se^+$  GPX szybciej zubaża pulę glutationu i wywołuje przejściowy wzrost aktywności GR

4. przypuszczalnie niektóre domeny GPX w nasionach klonu srebrzystego współdziałają z jonami Se.

Wykonano także badania nad wpływem szybkości poduszana nasion dębu szypułkowego (*Q. robur*) na ich przeżywalność, produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) i reakcje antyoksydacyjne. Osie zarodkowe wraz z częścią liścieni nasion dębu były poddawane szybkiemu (0.33%/h) (**S**) i wolnemu (0.17%/h) (**W**) poduszaniu. Do poziomu wody 40% nie obniżała się zdolność kiełkowania nasion. Różnice między wariantami wystąpiły przy 29% wilgotności nasion. W wariacie (**S**) wynosiła ona 48% a w wariacie (**W**) - 20,7%. Spadkowi żywotności nasion towarzyszył wzrost wypływu elektrolitu z osi (o 15% (**S**) i 28% (**W**)). W wariacie (**W**) odnotowano także wzrost poziomu MDA i FFA (wolnych kwasów tłuszczowych) oraz reaktywnych form tlenu (RFT), nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego. Antyutleniacze niskocząsteczkowe:  $\alpha$ -tokoferol, ASA (kwas askorbinowy) i fenole wykazywały różną reakcję na warunki stresowe. Zawartość  $\alpha$ -tokoferolu wyraźnie wzrosła w wariacie (**S**), a obniżyła się w wariacie (**W**). Zawartość ASA obniżała się stopniowo w obydwu wariantach. Poziom fenoli obniżył się bardziej w wariacie (**S**) i odpowiadał wzrostowi aktywności peroksydazy gwajakolowej (POX) w tym wariacie. Spośród antyutleniaczy enzymatycznych największe różnice między wariantami **S** i **W** wykazała POX i SOD (dysmutaza ponadtlenkowa), których aktywność była wyraźnie wyższa w wariacie (**S**). Inne enzymy jak APX (peroksydaza askorbinianowa) i GR wykazywały nieznacznie wyższą aktywność w wariacie (**S**). Powyższe badania po raz pierwszy wykazały (w liczbach) korzystniejszy wpływ szybkiego poduszania nasion *recalcitrant* na ich żywotność.

Badano optymalne warunki wzrostu buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) w kulturach *in vitro* z osi zarodkowych, izolowanych z nasion. Nasiona zebrano w nadleśnictwie Konstantynowo w 2008 r., poduszono do wilgotności ok. 10 % i wstępnie przechowano w szczelnie zamkniętych pojemnikach w temperaturze  $-3^{\circ}\text{C}$ . Testowano sposób izolacji i sterylizacji osi, oraz optymalne stężenie regulatorów wzrostu (IAA, NAA, BAP,  $\text{GA}_3$ ) w pożywce WPM (*Woody Plant Medium*). Najwyższy procent osi wykształcających pęd (50%) *in vitro* uzyskano po ich izolacji z wykorzystaniem binokularu oraz sterylizacji w 10% środka wybielającym ( $<5\%$  NaClO i  $<1\%$  NaOH). Izolacja osi z 4 mm fragmentem liścieni nie wpłynęła w istotny sposób na zwiększenie liczby osi tworzących pęd *in vitro*. Połączenie naturalnej auksyny IAA z cytokininą BAP (6-benzylaminopuryny) zapewniło najwyższy wzrost pędu. Giberelina ( $\text{GA}_3$ ) dodawana do pożywki WPM w ilości 100-400 ppm hamowała wzrost pędu osi zarodkowych. W ósmym tygodniu hodowli *in vitro* uzyskano ok. 25% siewek z pędem, pierwszymi liśćmi oraz korzeniem.

Wykonano badania dotyczące analizy funkcjonalnej białek związanych prawdopodobnie z ustępowaniem spoczynku nasion klonu zwyczajnego (*Acer platanoides*) i buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica*), charakteryzujących się głębokim fizjologicznym spoczynkiem zarodkowym. Szczegółowym celem było zbadanie ekspresji i roli białek związanych z trzema podstawowymi elementami odpowiedzialnymi za ustępowanie spoczynku nasion: transdukcją sygnału (kalretikulina), ekspresją genów (białko bogate w glicynę wiążące RNA, ABI3) i metabolizmem (adenozylhomocysteinaza). Zastosowano metodę immunodetekcji białek w oparciu o Western blotting, umożliwiającą określenie poziomu akumulacji poszczególnych białek w kolejnych etapach ustępowania spoczynku podczas stratyfikacji chłodnej. Wstępna analiza akumulacji kalretikuliny (białko odpowiedzialne za gospodarkę  $\text{Ca}^{2+}$ ) w czasie ustępowania spoczynku nasion klonu zwyczajnego pokazała, że jest ona najwyższa w 7 tygodniu stratyfikacji. W tym czasie rozpoczyna się też kiełkowanie pierwszych nasion klonu. Wyniki te wskazują na

powiązanie zmian w ekspresji kalretikuliny z ustępowaniem spoczynku nasion klonu oraz szczególnej roli, jaką odgrywa w niej wtórny przekaźnik sygnału, jakim są jony  $\text{Ca}^{2+}$ . Badania nad ekspresją genów związanych z ustępowaniem spoczynku nasion drzew będą kontynuowane w kolejnych latach.

Klon polny (*Acer campestre*) jest w Polsce gatunkiem najrzadziej spotykanym spośród rodzimych klonów. Jego duży potencjał adaptacyjny do siedlisk zdegradowanych stawia ten gatunek w rzędzie najbardziej przydatnych drzew do nasadzeń w dużych miastach. Trudności z pozyskaniem nasion i przewyciężaniem ich głębokiego spoczynku oraz znaczny udział nasion pustych w plonie sprawiają, że jest on względnie rzadko stosowany w zieleni miejskiej. Podjęte badania zmierzały do opracowania optymalnych warunków dla przerwania spoczynku nasion tego gatunku. Na podstawie wyników uzyskanych w roku 2008, w roku bieżącym zastosowano niższy zakres ciepłej fazy stratyfikacji ciepło-chłodnej skrzydlaków oraz podwyższono temperaturę z  $-3^{\circ}\text{C}$  do  $-1^{\circ}\text{C}$  w celu powstrzymania kiełkowania nasion po stratyfikacji. W przypadku skrzydlaków niepodszuszonych po zbiorze (oddzielnie z trzech drzew) nie stwierdzono różnic w zdolności kiełkowania nasion po zastosowaniu temperatury  $15^{\circ}\text{C}$  i  $20^{\circ}\text{C}$  podczas 5-tygodniowej ciepłej fazy stratyfikacji. W przypadku stratyfikacji skrzydlaków podszuszonych po zbiorze nasiona kiełkowały w zdecydowanie niższym procencie po zastosowaniu temperatury  $15^{\circ}\text{C}$  niż po zastosowaniu temperatury  $20^{\circ}\text{C}$  podczas ciepłej fazy stratyfikacji. Wydłużanie czasu chłodnej fazy stratyfikacji skrzydlaków może niekorzystnie wpływać na kiełkowanie nasion. Powstrzymanie kiełkowania nasion przez obniżenie temperatury do  $-1^{\circ}\text{C}$  na 4 tygodnie pozostawało, w zależności od drzewa matecznego, bez wpływu lub przyczyniało się do spadku ich kiełkowania.

Brak technicznych możliwości natychmiastowego podsuszenia zaraz po zbiorze dużych ilości nasion buka przyczynia się do szybkiego obniżenia ich jakości wywołanego oddziaływaniem grzybów patogenicznych oraz niekontrolowanym ustępowaniem spoczynku. W przeprowadzonym doświadczeniu badano możliwość wstępnego przechowania nasion buka w temperaturach ujemnych, poprzedzającego suszenie. Świeżo zebrane, nie podsuszane nasiona z trzech partii (nadm. Głusko i Gryfino) zostały przechowane w  $-3^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$  oraz  $-10^{\circ}\text{C}$  przez 4, 8, 12 i 26 tygodni. W tych samych temperaturach przechowywano nasiona podsuszone do wilgotności ok. 9%. Nasiona nie przechowywane, poddane stratyfikacji chłodnej w  $3^{\circ}\text{C}$  zaraz po zbiorze wschodziły średnio (dla wszystkich partii) w 74%, podsuszone w 71%. Podczas całego okresu przechowania podsuszonych nasion, we wszystkich badanych temperaturach i dla wszystkich partii nie stwierdzono istotnych zmian w liczbie uzyskiwanych siewek. Podobnie nie obserwowano spadku żywotności nasion podczas przechowania w temperaturze  $-3^{\circ}\text{C}$  i przysposobionych do siewu w  $3^{\circ}\text{C}$ . W temperaturze  $-5^{\circ}\text{C}$  spadek liczby uzyskanych siewek obserwowano dopiero po 26 tygodniach przechowania. W temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$  następowało stopniowe obniżanie żywotności nasion (po 4 tyg. średnie wschody 60%, po 26 tyg. 46%). Uzyskane wyniki wskazują na możliwość bezpiecznego krótkoterminowego przechowania świeżo zebranych nasion buka w  $-3^{\circ}\text{C}$ .

Wykonano badania nad ustępowaniem spoczynku nasion irgi hupejskiej (*Cotoneaster hupehensis* Rehder & E.H. Wilson). Badania przeprowadzono na nasionach świeżych i podsuszonych zaraz po zbiorze. Nasiona stratyfikowano w układzie ciepło-chłodnym. W fazie ciepłej zastosowano trzy temperatury stałe:  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  i  $25^{\circ}\text{C}$  i trzy cyklicznie zmieniające się:  $15\sim 20$ ,  $15\sim 25$  i  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  przez 12, 16 i 20 tygodni, a w fazie chłodnej temperaturę  $3^{\circ}\text{C}$ , do czasu pojawienia się pierwszych nasion kiełkujących. Badania pokazały, iż po wszystkich zastosowanych układach cieplnych stratyfikacji nasiona nie były zdolne do kiełkowania, pomimo stwierdzonej wysokiej żywotności (88% nasion pełnych w próbie krojenia). Nasiona irgi hupejskiej najkorzystniej jest przysposobić do

kiełkowania przez skaryfikację w stężonym kwasie siarkowym (przez 3 godziny) i stratyfikację ciepło-chłodną w temperaturze 20~30°/3°C, przez odpowiednio 4 + 22 tygodnie, tj. do czasu pojawienia się pierwszych nasion skiełkowanych. W najwyższym procencie (48%) nasiona skiełkowały w temperaturze cyklicznie zmiennej 3~20°C. Zastosowanie krótszych czasów skaryfikacji i tylko chłodnej stratyfikacji przyczyniało się również do ustępowania spoczynku nasion, lecz ich zdolność kiełkowania była niższa aniżeli po stratyfikacji w optymalnym układzie cieplnym. Po przedsięwzięciu przysposobieniu nasiona kiełkowały w wyższym procencie w temperaturze cyklicznej 3~20°C niż w stałej 3°C.

## Zadanie 2. Wpływ ultra niskiej temperatury (-196°C) na kriokonserwację, żywotność i fizyko-biochemiczne zmiany w tkankach nasion oraz merystemów wierzchołkowych drzew i krzewów

Wykonywał: P.M. Pukacki, M. Matelska

Obiektem badań były osie zarodkowe nasion *recalcitrant* (wrażliwych na podsuszanie): *Acer pseudoplatanus*, *A. saccharinum*, i *Q. robur*, *orthodox* (odpornych na desykcję): *A. platanoides* i *suborthodox* (pośrednio wrażliwych): *Fagus sylvatica*. Badano właściwości kriochronne białek występujących w osiach zarodkowych ww. nasion. Stwierdzono wyraźne działanie obniżenia temperatury krystalizacji lodu tj. histerezę temperaturową (TH) całkowitych ekstraktów białkowych z osi, a także frakcji białek o masach <30 kDa i >30 kDa. Najwyższą wartość TH wykazały białka z osi zarodkowych nasion klonu zwyczajnego (*A. platanoides*) i jaworu (*A. pseudoplatanus*), a najniższą z osi dębu szypułkowego (*Q. robur*). Ponadto stwierdzono, że frakcja białek o masach <30 kDa powoduje istotne opóźnienie inokulacji lodu oraz hamowanie jego migracji. W obecności białek TH, osi zarodkowych nasion gatunku tolerancyjnego na desykcję, *A. platanoides*, obserwuje się 2-krotnie większe hamowanie szybkości migracji lodu w porównaniu do białka albuminy (BSA). Uzyskane wyniki ukazują, że są to białka, które mają również zdolność hamowania szybkości inokulacji kryształów lodu. Białka TH badanych osi zarodkowych nasion cechuje również działanie kriochronne w stosunku do wrażliwego na niskie temperatury enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Szczególnie dotyczy to frakcji białek o masach < 30 kDa, która przy stężeniu 25 µg/ml zachowywała 98% aktywności LDH po zamrożeniu w -196°C. Aktywność kriochronna tych białek była pięciokrotnie wyższa w porównaniu z albuminą. Podobnie silne działanie kriochronne w stosunku do enzymu LDH wykazują białka apoplastowe igieł kilku gatunków drzew iglastych. Z rozdziału elektroforetycznego frakcji białek o masach < 30 kDa badanych osi wyodrębniono pasmo o masie cząsteczkowej 22 kDa i po wykonaniu elektrotransferu na błonę nitrocelulozową PVDF dokonano sekwencjonowania białek *A. platanoides* i *A. pseudoplatanus*. Skład aminokwasowy tych białek jest identyczny (G L E E T L X T L S L K R N I N K P S L). Zdolność przeciwdziałania zamarzaniu (AFP) tych białek wynika prawdopodobnie z obecności w ich strukturach domen hydrofilowych, które mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych z cząsteczkami wody. Wskazuje na to wysoka obecność (41%) hydrofilnych aminokwasów, takich jak Asn, Ser i Thr.

Badano wrażliwość na podsuszanie izolowanych osi zarodkowych nasion odpornych (*A. platanoides*) i wrażliwych (*A. pseudoplatanus*) na desykcję, przed zabiegiem kriokonserwacji. Pod wpływem stresu desykcji w osiach zarodkowych *A. pseudoplatanus* znaczący wzrost wpływu elektrolitu występował przy odwodnieniu

poniżej 46%, podczas gdy w osiach *A. platanoides* dopiero przy 10%. Świadczy to o utracie integralności błon cytoplazmatycznych na skutek peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych błon, co potwierdził także wzrost zawartości aldehydu malonowego (MDA). W czasie wstępnej desykcji osi stwierdzono także wzrost produkcji reaktywnych form tlenu: nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego, który wystąpił w przypadku osi *A. platanoides* przy podsuszeniu do ok. 11% wody, a w przypadku *A. pseudoplatanus* przy 40%. Pozytywny wynik zamrożenia i przechowywania w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  bez udziału krioprotektantów osi zarodkowych *A. platanoides* uzyskano przy zawartości wody 9-14%, natomiast dla osi zarodkowych *A. pseudoplatanus* nie uzyskano bezpiecznego poziomu wody umożliwiającego zamrażanie w LN. W celu krioprezerwacji osi zarodkowych nasion jaworu konieczne jest zastosowanie roztworów kriochronnych.

Uzyskano sukces w krioprezerwacji osi zarodkowych nasion bardzo wrażliwych na desykcję *Acer saccharinum*. Eksplantanty przeżyły w 45% przechowanie w  $-196^{\circ}\text{C}$ . Na pożywce WPM tkanki rozwijają się w formie komórek kalusowych.

### Zadanie 3. Somatyczna embriogeneza jako metoda konserwacji i reprodukcji cennego genetycznie materiału roślinnego

Wykonywały: K. Bojarczuk, T. Hazubska-Przybył, E. Sobczak

Przeprowadzono badania nad przysposobieniem tkanki embriogennej *Picea abies* do zamrożenia w ciekłym azocie, przy zastosowaniu kwasu abscysynowego (ABA) na etapie tzw. prekultury. ABA stosowany jest przy opracowywaniu efektywnych metod kriokonserwacji, jako substancja pozwalająca podwyższyć tolerancję przechowywanego materiału, w formie komórek, tkanek czy fragmentów roślin, na działanie ultra niskiej temperatury ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Badano czy zastosowanie ABA podczas prekultury wpłynie na tempo wzrostu traktowanej tkanki embriogennej, a w konsekwencji na poprawienie jakości tkanki przeznaczonej do kriokonserwacji. Fragmenty tkanki embriogennej poddano tygodniowej dehydratacji w zmodyfikowanej pożywce Litvay'a LM ( $\frac{1}{2}$  LM), uzupełnionej sacharozą o wzrastającym stężeniu (0,25 – 1M) lub sacharozą o wzrastającym stężeniu i ABA, w dawce 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Po dehydratacji tkankę hodowano w pożywce namnażającej  $\frac{1}{2}$  LM i określono tempo wzrostu tkanki embriogennej w trakcie 28-dniowej kultury. Stwierdzono, że dodanie ABA (w stężeniu 20 i 10  $\mu\text{M}$ ) podczas prekultury tkanki w pożywce z sacharozą o wzrastającym stężeniu, poprawiło jej wzrost w trakcie kultury na pożywce namnażającej. W 28 dniu kultury tkanka embriogenna uzyskiwała 3-4-krotnie wyższy wzrost, w stosunku do tkanki poddanej dehydratacji jedynie w obecności sacharozy. Podobną zależność zaobserwowano po dehydratacji tkanki embriogennej w pożywce Litvay'a ( $\frac{1}{2}$  LM) z dodatkiem sacharozy o wzrastającym stężeniu lub sacharozy i ABA, w dawce 10  $\mu\text{M}$ , a następnie podsuszeniu nad żelem krzemionkowym (2 godziny, w temp.  $25^{\circ}\text{C}$ ), do poziomu zawartości wody w tkance ok. 20%. Tkanka embriogenna, którą dodatkowo traktowano ABA, osiągała niemal 8-krotnie wyższy wzrost na pożywce namnażającej w 56 – dniu kultury, w porównaniu z tkanką, poddaną dehydratacji bez ABA.

Uzyskane wyniki wskazują na ochronne działanie ABA wobec tkanki embriogennej *Picea abies*, poddawanej procesom dehydratacji i silnemu podsuszeniu nad żelem krzemionkowym. Wykonanie tych zabiegów jest konieczne przed zamrożeniem tkanki w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ , aby nie doszło do uszkodzenia komórek po zamrożeniu.

### Temat 3. Zachowanie zasobów genowych topoli oraz określenie ich przydatności na potrzeby bioenergii, agroleśnictwa i fitoremediacji

koordynator: A. Lewandowski

#### Zadanie 1. Rozpoznanie i zachowanie zasobów genowych topoli

Wykonywali: K. Bojarczuk, A. Boratyński, M. Dering, M. Filipiak, A. Lewandowski, M. Litkowiec i W. Wachowiak, M. Ratajczak, T. Hazubska-Przybył, E. Sobczak

Badania skoncentrowano na topoli czarnej (*Populus nigra*). W ostatnim czasie topola czarna staje się coraz rzadszym składnikiem naszej flory. Dlatego podjęto działania, których celem jest ochrona puli genowej tego gatunku z rezerwatu Wielka Kępa Ostromecka. Rezerwat został utworzony w 1953 roku w celu zachowania fragmentu nadwiślańskiego lasu łęgowego z licznymi drzewami pomnikowymi. Obecnie zbiorowiska takie są rzadkością ze względu na zagospodarowanie ich przez człowieka. W momencie tworzenia rezerwatu znaczną jego część zajmował zespół łągu wierzbowo-topolowego, w którym topola czarna była drzewem pospolitym. Ostatnio w efekcie ograniczenia zalewów, na skutek budowy zapory we Włocławku, zespół ten przekształcił się stopniowo w łąg wiązowo-jesionowy. Zmiany te są niekorzystne dla topoli czarnej, uniemożliwiając jej naturalne odnawianie. W krótkim czasie doprowadziło to do tego, że w rezerwacie brak jest młodych osobników topoli, a stare, prawie 200 letnie, stopniowo giną. Obecnie w rezerwacie pozostało 20 starych topoli, podczas gdy jeszcze dziesięć lat wcześniej było ich 40. W dodatku na obrzeżach rezerwatu założono plantacje topolowe z odmianami mieszańcowymi, co może doprowadzić do erozji genetycznej lokalnej populacji. Zimą tego roku ze wszystkich żyjących osobników topoli czarnej zebrano pędy do analiz genetycznych i rozmnożenia wegetatywnego. Na podstawie analizy 10 polimorficznych loci mikroatelitarnych określono podstawowe parametry genetyczne ginącej populacji. Mimo niewielkiej liczby osobników, jakie pozostały, populacja charakteryzuje się bardzo wysokim poziomem zmienności genetycznej oraz niewielką wsobnością (średnia heterozygotyczność obserwowana = 0,766, średnia liczba alleli w locus = 11, współczynnik wsobności  $F = 0,051$ ). Stwierdzony poziom zmienności genetycznej badanej populacji jest podobny do tego, jaki podaje się w literaturze dla topoli czarnej. Każde z badanych drzew posiada odrębny, charakterystyczny dla siebie genotyp. Zgromadzone informacje jednoznacznie wskazują, że pozostałe przy życiu osobniki topoli czarnej z populacji Wielka Kępa Ostromecka są odpowiednim materiałem, który powinien posłużyć do programu ochrony i restytucji topoli czarnej. Dalszym etapem prac było namnożenie topoli. W wyniku rozmnożenia wegetatywnego uzyskano łącznie 67 osobników potomnych (od 2 do 9 z drzewa). Najbardziej wydajna okazała się metoda szczepienia na podkładce topoli czarnej, udatność 52%. Mniej efektywne było ukorzenianie sadzonek zdrewniałych (23%), a najmniej szczepienie na mieszańcu *P. x euramericana* (9%). Podjęto również próby hodowli 5 osobników w warunkach *in vitro*. Dwa z nich są namnażane w kulturach z pąków bocznych. W następnym roku na terenie Arboretum Kórnickiego, z rozmnożonego materiału, zostanie założone archiwum klonów topoli czarnej.

## Zadanie 2. Topole jako źródło energii odnawialnej

Wykonywali: A. Lewandowski i K. Ufnalski

Zadanie obejmowało prace związane z wykorzystaniem topoli jako źródła energii odnawialnej. W tym roku ukorzeniono po około sto osobników reprezentujących osiem odmian topoli mieszańcowych, które w przyszłym roku posłużą do założenia powierzchni doświadczalnej.

## Zadanie 3. Topole w remediacji zdegradowanego środowiska

Wykonywali: G. Lorenc-Plucińska, K. Stobrawa, K. Ufnalski, K. Grewling

W ostatnich latach wnikliwie rozważa się wykorzystanie roślin do oczyszczania gleb z metali ciężkich lub ich unieszkodliwienia. Niektóre gatunki drzew charakteryzują się stosunkowo wysokim potencjałem pobierania jonów metali ciężkich z gleby i gromadzenia ich w częściach nadziemnych, oraz redukcji biodostępności metali poprzez immobilizację lub utrudnione przemieszczanie.

Rośliny wykształciły kompleksową sieć homeostatycznych mechanizmów służących kontroli pobierania, akumulacji, przemieszczania i unieszkodliwienia toksycznych jonów metali. Należą do nich np. obniżone pobieranie, utrudnione przemieszczanie się do pędu nadziemnego i obrona przed stresem oksydacyjnym. Taki kierunek zmian notowaliśmy we wcześniejszych badaniach z różnymi gatunkami topoli uprawianymi w glebie pobranej ze stref ochronnych huty miedzi i zawierającej fitotoksyczne stężenia jonów Cu i Pb oraz podwyższone stężenia Cd i Zn.

Obecnie prowadzone badania dotyczą możliwości wykorzystania topoli do remediacji terenów zanieczyszczonych przez osady pogarbarskie powstające po strąceniu ścieków z procesu technologicznego wyprawiania skór i futer metodą chromową. Materiał doświadczalny stanowiły zrzesy korzeniowe topoli (*Populus tremula* L.), ukorzeniane w glebie pobranej z instytutowej szkółki topolowej w Kórniku lub zmieszanej w różnych proporcjach (25, 50 i 100%) z wysuszonym i przesianym osadem pogarbarskim, pobranym na składowisku garbarni. Jako gatunek referencyjny wybrano często zalecaną dla potrzeb remediacji wierzbę krzaczastą (*Salix viminalis* L.), której zrzesy pędów nadziemnych ukorzeniano w takich samych wariantach stężeń osadu pogarbarskiego, jak w przypadku topoli. Przed posadzeniem zrzesów obu gatunków drzew wykonano analizę mineralną i mikrobiologiczną użytego podłoża. Uprawę topoli i wierzby prowadzono w zacienionym tunelu foliowym, odpowiednio przez 20 i 16 tygodni. Po jej zakończeniu wykonano analizę zdolności topoli i wierzby do akumulacji wybranych mikro- i makroelementów, oznaczono stopień ich tolerancji na związki chemiczne zawarte w osadzie pogarbarskim, wykonano pomiary morfologiczne i morfometryczne uprawianych roślin oraz podjęto próby identyfikacji białek uwikłanych w metabolizm obu gatunków drzew rosnących w zanieczyszczonym podłożu.

Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno topola jak i wierzba rosnące w podłożu z różnymi stężeniami osadu pogarbarskiego, w których stężenia jonów Cr przekraczały zakres

stężeń krytycznych i były fitotoksyczne, nie wykazały symptomów toksyczności Cr. Świadczy to ich wyjątkowej tolerancji na jony Cr. Porównywalny wzrost i rozwój topoli w wariantcie z osadem pogarbarskim i w kontroli prawdopodobnie był wynikiem zdolności obu tych gatunków drzew do wykorzystania dużej zawartości substancji organicznych i mineralnych osadu, co najmniej przez okres prowadzonej uprawy, czyli 20 tygodni.

## Opis i uzyskane wyniki w zakończonych projektach własnych

### **Geograficzna struktura polimorfizmu mtDNA świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.) w Polsce ( 2 P0L 014 30)**

Kierownik projektu: A. Lewandowski

Okres realizacji: 08.06.2006 – 07.06.2009

Na podstawie analizy geograficznego rozmieszczenia haplotypów mitochondrialnego DNA w 59 populacjach świerka pospolitego z terenu Polski ustalono, że:

1. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami badań palinologicznych, północno-wschodni i południowy zasięg świerka pospolitego w Polsce zostały ukształtowane przez odmienne refugia. Świerk z północnej Polski rodowodowo wywodzi się z refugium zachodnio-rosyjskiego, natomiast świerk z południa Polski pochodzi z refugium karpackiego. Na terenie Polski obecne są, zatem dwie, niezależne pod względem pochodzenia, pule genowe świerka pospolitego.
2. Obszar uznawany za „strefę bezświerkową” nie jest w rzeczywistości pozbawiony tego gatunku i reprezentuje strefę łączącą zasięg borealny i południowy świerka pospolitego w Europie. Należy zasięg tego gatunku rozpatrywać wyłącznie jako ciągły bez wyróżniania dysjunkcji środkowopolskiej w jego europejskim zasięgu.
3. Strefę kontaktu między zasięgami należy prawdopodobnie rozszerzyć na północy o kompleks Puszczy Białowieskiej, ponieważ świerk pospolity obecny na tym terenie, wywodzi się równocześnie z refugium karpackiego i zachodnio-rosyjskiego.
4. O dynamice polodowcowej kolonizacji świerka pospolitego w Polsce decydowało refugium karpackie, z którego świerk przywędrował wcześniej. Z tego powodu w strefie przejściowej pomiędzy oboma zasięgami dominuje świerk pochodzenia południowego.
5. Metoda wykorzystana w badaniach przedstawionych w tej pracy z powodzeniem może znaleźć zastosowanie w testowaniu pochodzenia drzewostanów zlokalizowanych w ramach naturalnego zasięgu tego gatunku. Szczególnie istotne znaczenie ma to w przypadku Wyłączonych Drzewostanów Nasiennych i drzew doborowych, które stanowią kluczowe elementy, prowadzonego przez Lasy Państwowe, programu zachowania leśnych zasobów genowych.
6. Ustalenia dotyczące naturalnego pochodzenia strefy łączącej borealny i południowy zasięg świerka pospolitego na terenie Polski centralnej pozwalają na potencjalne włączenie go w obszar hodowli świerka pospolitego, co wcześniej już sugerowano. Należy jednak wziąć pod uwagę specyfikę warunków klimatycznych panujących w Polsce środkowo-wschodniej.

### **Proteomika wybranych gatunków topoli w warunkach stresu Cd, Cu i Pb. Identyfikacja białek kluczowych dla mechanizmów tolerancji (N305 086 31/3289)**

Kierownik: Krzysztof Stobrawa

Okres realizacji: 09.11.2006 – 08.06.2009

Zrzeszy 4 topoli (*P. nigra*, *P. deltoides*, *P. nigra x deltoides*, *P. trichocarpa*) zostały ukorzenione w glebie z dodatkiem soli metali ciężkich. Osobno ukorzeniano rośliny w glebie

z dodatkiem Cu (300 ppm CuSO<sub>4</sub>), Cd (30 ppm CdSO<sub>4</sub>) i Pb (600 ppm PbNO<sub>3</sub>). Rośliny hodowano w namiocie foliowym w 2,5 litrowych doniczkach przez okres od kwietnia do sierpnia. W trakcie sezonu wegetacyjnego zaobserwowano istotną inhibicję wzrostu pędów i korzeni u topoli rosnących na glebie zawierającej Cu oraz Pb oraz indukcję wzrostu pędów i korzeni roślin ukorzenionych na wariancie Cd.

W zebranych materiale roślinnym zostało oznaczone stężenie metali ciężkich. Wykazano, że wszystkie badane metale są silnie absorbowane przez korzenie. Szczególnie wysoką absorpcję stwierdzono w przypadku Pb. Dla tego metalu nie stwierdzono jednak translokacji do liści. W przypadku Cu translokacja do liści była niewielka i jedynie dla Cd wykazano istotny poziom translokacji metalu do liści.

Analiza proteomiczna zebranych próbek wykazała obecność istotnych różnic w poziomie ekspresji niektórych białek. W zależności od gatunku i analizowanego organu, na żelach 2D udało się rozdzielić w postaci spotów następujące ilości białek: *P. nigra* (korzeń: 1033, liście: 637), *P. nigra x deltoides* (korzeń: 1090, liście: 578), *P. deltoides* (korzeń: 1069, liście: 583), *P. trichocarpa* (korzeń: 866, liście: 515). Spośród nich określono tzw. białka różnicujące tj. takie, które w odpowiedzi na zadany stres metali ciężkich wykazują zmienność ekspresji – najczęściej obserwowano wzrost ekspresji białka pod wpływem stresu. W kilku przypadkach zaobserwowano obniżenie ekspresji białka. Dla poszczególnych gatunków i organów stwierdzono następujące ilości białek różnicujących: *P. nigra* (korzeń: 43, liście: 17), *P. nigra x deltoides* (korzeń: 49, liście: 14), *P. deltoides* (korzeń: 39, liście: 16), *P. trichocarpa* (korzeń: 13, liście: 8). Wybrane (najbardziej spektakularne) spoty poddano identyfikacji metodą spektroskopii mas. Na podstawie uzyskanych fragmentów sekwencji aminokwasowej podjęto próbę identyfikacji białek na bazie udostępnionych w sieci istniejących genetycznych baz danych topolowych. Zidentyfikowane białka należą do następujących grup: jednostki translacyjne, białka HSP, białka związane z metabolizmem antyoksydacyjnym, białka aparatu fotosyntezy.

### **Wpływ chemizmu gospodarza i warunków świetlnych na żerowanie foliofagów na liściach krzewów podszytu leśnego (N309 002 31/0246)**

Kierownik projektu: P. Karolewski

Okres realizacji: 26.09.2006 – 25.09.2009

O odporności krzewów na żerowanie owadów roślinożernych decydują w dużym stopniu warunki świetlne ich wzrostu. Światło wpływa na strukturę liści i zawartość w nich metabolitów, a przez to na wielkość zgryzień powodowanych przez foliofagi. Najczęściej przyjmuje się, że rośliny rosnące w lepszych warunkach świetlnych są odporniejsze na żerowanie owadów. Przyczyny i mechanizmy tych zależności nie są w pełni poznane, a tym bardziej nie są wyjaśnione przypadki odmiennej reakcji niektórych roślin.

Badania wykonano na 6 gatunkach krzewów: bzie czarnym (*Sambucus nigra*), czeremsze amerykańskiej (*Prunus serotina*), czeremsze zwyczajnej (*Prunus padus*), dereniu świdwie (*Cornus sanguinea*), kruszynie pospolitej (*Frangula alnus*) oraz leszczynie pospolitej (*Corylus avellana*). Celem badań było: 1) wyjaśnienie przyczyn dużych różnic w stopniu zgryzania liści przez foliofagi między gatunkami krzewów, 2) określenie wpływu warunków świetlnych na zgryzienia liści badanych gatunków krzewów, w tym wyjaśnienie przyczyn odmiennej reakcji leszczyny oraz 3) określenie wpływu stopnia zgryzania liści krzewów na ich rozkład (ścioty) i pośrednio na rozkład liści drzew (dębu i sosny). Dodatkowo, przeprowadzono analizę porównawczą w celu ustalenia, które z gatunków

owadów żerujących na liściach krzewów podszytu są jednocześnie szkodnikami drzew, głównych gatunków lasotwórczych w Polsce.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie wniosków, z których najważniejszymi są:

1) Badane gatunki krzewów można podzielić na trzy grupy: a) gatunki słabo zgryzane – dereń świdwa, bez czarny i kruszyna pospolita, b) średnio zgryzane – czeremcha amerykańska i leszczyna pospolita oraz c) silnie zgryzane – czeremcha zwyczajna.

2) Określonego powyżej zróżnicowania nie można w pełni wyjaśnić różnicami w zawartości badanych związków obronnych i składników pokarmowych. Można jednak stwierdzić, że: a) przyczyną dużej odporności liści dereń na zgryzienia jest relatywnie wysoka zawartość w nich sumy rozpuszczalnych fenoli (SF) i skondensowanych tanin (odporność konstytutywna) oraz zdolność do indukcji syntezy tych związków w młodych, nowo powstałych liściach, b) małe zgryzienia liści bzu czarnego mogą być spowodowane ich małą atrakcyjnością dla owadów ze względu na niską zawartość cukrów niestrukturalnych (TNC), szczególnie w początkowym okresie sezonu wegetacyjnego, c) większa odporność na zgryzienia czeremchy amerykańskiej, w porównaniu do czeremchy zwyczajnej, jest prawdopodobnie związana z wyższym poziomem SF i tanin u pierwszego z wymienionych gatunków.

3) Mniejsze zgryzienia liści krzewów rosnących w świetle niż w cieniu można wyjaśnić wyższym poziomem związków obronnych i niższym azotu u pięciu badanych gatunków krzewów. U leszczyny powodem większych zgryzień liści bardziej oświetlonych może być wyższa zawartość w nich TNC.

4) Wpływ światła na zawartość metabolitów obronnych w liściach, w zależności od umiejscowienia w koronie krzewu (liści typu świetlnego i cienistego), jest podobny jak liści krzewów rosnących, odpowiednio w warunkach pełnego światła i w cieniu.

5) Podwyższoną indukowaną odpornością natychmiastową (RIR – ang. rapid induced resistance) charakteryzują się gatunki krzewów silnie zgryzanych w naturze przez foliofagi: czeremchy zwyczajnej i amerykańskiej oraz leszczyny.

6) Obydwa gatunki czeremch nie przejawiają natomiast tzw. opóźnionej odporności indukowanej (DIR – ang. delayed induced resistance), cechującej się wyższym poziomem związków obronnych w młodych, nowopowstałych liściach. Liście te powstają dopiero po zakończeniu żerowania głównego ich szkodnika – *Phytodecta quinquepunctata*. Tego typu odporność wykazują natomiast dereń świdwa i leszczyna pospolita.

7) Większość gatunków foliofagów preferuje liście krzewów zacienionych niż oświetlonych. Wyjątkiem jest susówka (*Altica brevicollis*), preferująca bardziej oświetlone liście leszczyny.

8) Przyczyną większych zgryzień liści leszczyny rosnącej w warunkach silniejszego oświetlenia jest liczniejsze występowanie na nich głównego szkodnika tego gatunku ww. *A. brevicollis*. Ponadto, odpowiedzialną za większe zgryzienia liści leszczyny rosnącej w świetle, jest również mniejsza liczebność gatunków owadów drapieżnych występujących na tych krzewach. Natomiast zależności tych nie można wytłumaczyć różnicami w liczbie włosków (mechanicznych i wydzielniczych), ponieważ na oświetlonych liściach u tego gatunku jest ich dwukrotnie więcej niż na zacienionych.

9) Liczba gatunków foliofagów jest u większości gatunków krzewów podobna do liczby gatunków zoofagów (drapieżników). Tylko u bzu czarnego liczba gatunków drapieżników wyraźnie przeważa nad liczbą gatunków foliofagów. Zależność ta istnieje niezależnie od warunków świetlnych wzrostu krzewów.

10) Spośród 66 gatunków foliofagów żerujących na krzewach podszytu 65% z nich żeruje także na drzewach gatunków ważnych z gospodarczego punktu widzenia, a dla prawie 25% z nich różne gatunki drzew są podstawową bazą pokarmową. Należy więc przyjąć, że

warstwa podszytu leśnego stanowi refugium lub dodatkową bazę pokarmową dla szkodników drzew leśnych przy braku innego pokarmu lub w czasie oprysków sanitarnych lasu.

11) Wczesnowiosenna defoliacja wpływa negatywnie na wzrost części nadziemnych i podziemnych siewek. Światło i gatunek krzewu mają niewielki wpływ na redukcję wzrostu siewek spowodowanego defoliacją.

12) Im gatunki krzewów są w naturze silniej zgryzane przez foliofagi, tym zgryzione liście rozkładają się szybciej od liści nieuszkodzonych. Liście tych gatunków krzewów rozkładają się szybciej pod okapem drzew sosny zwyczajnej niż dębu szypułkowego.

## Opis i uzyskane wyniki w zakończonych projektach promotorskich

### Zastosowanie zaawansowanej analizy molekularnej do identyfikacji wybranych mikoryz 12 gatunków drzew leśnych (N304 012 32/0934)

Kierownik projektu: M. Rudawska

Okres realizacji: 26.04.2007 – 25.01.2009

W ramach powyższego projektu wykonano analizy identyfikacji symbionta ektomikoryzowego przy zastosowaniu techniki klonowania oraz sekwencjonowania rejonu ITS (internal transcribed sequence). Analizy powyższe wykonano, gdy niemożliwe było uzyskanie jednorodnej sekwencji rejonu ITS pochodzenia grzybowego z poszczególnych ektomikoryz. Do powyższych analiz pobrano ektomikoryzy z 12 gatunków drzew leśnych rosnących w monokulturach. W sumie pobrano kilkadziesiąt wierzchołków ektomikoryzowych należących do 37 morfotypów. Po namnożeniu rejonu ITS z ektomikoryz, wklonowano je do wektora przy użyciu zestawu do klonowania pGEM-Teasy. Powyższe konstrukty DNA transformowano do bakterii, z których następnie namnożono fragmenty ITS (850 reakcji). Z nich do sekwencjonowania wybrano 195 fragmentów.

Dzięki temu uzyskano jednorodne sekwencje 37 gatunków grzybów ektomikoryzowych (ECM) i 46 gatunków innych grzybów będących endofitami korzeniowymi, patogenami, saprotrofami i inne. Zidentyfikowane grzyby ECM to: *Amanita muscaria*, *A. fulva*, *Clavulina* sp., *Clavulinaceae* sp., *Cortinarius alboviolaceus*, *C.cf. sertipes*, *Dermocybe auriantiobasis*, *Genea hispidula*, *Hebeloma velutipes*, *Inocybe phaeocomis*, *Inocybe* sp., cf. *Inocybe*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius blennius*, *L. tabidus*, *L. quietus*, *L. rufus*, „mycorrhizal basidiomycete”(nr akcesyjny AB089818), „mycorrhizal fungal sp. pkc 18” (nr akc. AY394900), *Paxillus involutus*, *Russula betularum*, *R. fragilis*, *Sclerodermataceae* sp., *Thelephorales* (nr akc. DQ195591), *Thelephoraceae* sp. (nr akc. AF430259), *Thelephoraceae* sp. (nr akc. DQ195592), *Tomentella botryiodes*, *T. stuposa*, *T. sublilacina*, *Tomentella* sp. (nr akc. AM161537), *Tomentellopsis echinospora*, *Tricholoma muricatum*, *Tylospora asterophora*, “uncultured ECM (*Russula*)”, “uncultured ECM fungus (nr akc. AJ534704), *Xerocomus badius*, *X. pruinatus*. Wśród pozostałych grzybów są m. in.: *Phialocephala fortinii*, *Rhizoscyphus ericeae*, *Geomyces pannorum*, *Mortiella macrocystis*, *Trichosporon porosum*, *Trichoderma asperellum*, *Heyderia abietis*, *Porosphaella cordanophora* i inne.

Morfotypem zasiedlanym przez największą liczbę grzybów był morfotyp 8, występujący u brzozy, modrzewia, świerka, sosny zwyczajnej, dębu szypułkowego i czerwonego. Zidentyfikowano w nim, oprócz symbionta ECM-*Paxillus involutus*, w sumie 10 innych gatunków grzybów. Morfotyp 34 u buka tworzył grzyb *Hebeloma velutipes*, a dodatkowo zidentyfikowano w nim 4 inne gatunki grzybów niemikoryzowych.

Dwa morfotypy skolonizowane były przez 2 gatunki grzybów ECM jednocześnie. Do nich należą: morfotyp 8 u świerka zasiedlony przez *P. involutus* i *X. badius* oraz morfotyp 30 u dębu czerwonego, w którym wykryto DNA *R. fragilis* i *A. fulva*.

Zastosowana metoda okazała się bardzo efektywna w identyfikacji symbiontów ektomikoryzowych u badanych gatunków drzew leśnych.

Opis i uzyskane wyniki w zakończonych badaniach zleconych

**Przechowywanie i przysposabianie nasion w warunkach kontrolowanych 3-5 lat dla nasion gatunków lekkonasiennych Brz, Olsz oraz Bk, Db, Jd, Jałowca i innych**

Temat zlecony przez DGLP, realizowany w latach 2004-2009

Kierownik tematu: T. Tylkowski

Podczas kilkuletnich badań nad wpływem warunków przechowywania nasion po zbiorze stwierdzono, że laboratoryjna zdolność kiełkowania nasion jodły pospolitej, brzozy brodawkowatej i omszonej oraz olszy czarnej jest nieadekwatnym wskaźnikiem ich jakości siewnej. Brakowi istotnych zmian w zdolności kiełkowania nasion podczas przechowywania towarzyszył systematyczny spadek wschodów w uprawie pojemnikowej w tunelu (brzoza i olsza) i w szkółce leśnej (jodła).

Opracowano skuteczną, nowatorską metodę przewycięzania spoczynku nasion jałowca pospolitego i sposób przedsięwziętego postępowania z nasionami zarówno w uprawie pojemnikowej jak i w szkółce.

Opracowano i wdrożono do praktyki leśnej (szkółka w nadleśnictwie Jarocin) sposób uprawy pojemnikowej, siewek topoli czarnej i topoli białej, tj. gatunków wypieranych i ustępujących z naturalnych siedlisk łągowych.

Na przykładzie nasion buka zwyczajnego wykazano możliwość ich krótkoterminowego (do kilkunastu tygodni) przechowywania w temperaturze poniżej 0°C zaraz po zbiorze, jeszcze przed podsuszaniem. Zastosowanie termoterapii bukwi w wilgotnym powietrzu jest skuteczne w zwalczaniu grzybów patogenicznych występujących na nasionach. Mniej przydatna okazała się termoterapia orzeszków w wodzie.

Długoterminowe przechowywanie (przez 25 lat) nasion róży pospolitej nie spowodowało spadku ich zdolności kiełkowania, po przechowaniu i przysposobieniu nasion do kiełkowania przez stratyfikację ciepło-chłodną 25°/3°C, w podłożu.

Opracowano wstępnie warunki przechowywania i kiełkowania nasion woskownicy europejskiej, gatunku objętego ochroną prawną.

**Program testowania potomstwa WDN, DD, PN, PUN w ramach «Programu zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych na lata 1991-2010»**

Temat zlecony przez Instytut Badawczy Leśnictwa w 2009 roku.

Kierownik tematu: W. Chałupka

W roku sprawozdawczym pracownicy Pracowni Genetyki Populacyjnej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku dokonali oceny przeżywalności sadzonek po dwóch sezonach wegetacyjnych oraz konsultowali z pracownikami Nadleśnictwa niezbędne prace pielęgnacyjne na powierzchniach testujących populacje i drzewa mateczne buka zwyczajnego. na terenie Nadleśnictwa Okonek.

Przeciętna przeżywalność na powierzchni doświadczalnej testującej potomstwo z drzewostanów matecznych wyniosła 93,0%. Najwyższą przeżywalnością charakteryzowała się populacja nr 791 (Kartuzy) – 98,0 %, natomiast najniższą przeżywalnością cechowały się dwie populacje: 832 (Tomaszów Lub.) – 88,7% oraz 584 (Czersk) – 88,8%. Standard lokalny nr 658 (Okonek) oraz standard krajowy nr 751 (Kwidzyn) osiągnęły wartości w pobliżu średniej dla całej powierzchni doświadczalnej, odpowiednio 92,5% i 93,8%.

Na powierzchni testującej potomstwo drzew matecznych (rody) buka pospolitego, oprócz oceny przeżywalności, sprawdzano zgodność miejsca posadzenia sadzonek z lokalizacją na planie i dokonano weryfikacji wiosennych poprawek. Po uzupełnieniu luk sadzonkami z rezerwy zgodnie z przyjętymi założeniami programu testowania, pozostało na powierzchni łącznie 7351 sztuk sadzonek, tj. 99,4% początkowego stanu liczbowego.

### **Populacyjna zmienność buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) w Polsce (wzrost i rozwój w okresie młodnika)**

Temat zlecony przez Instytut Badawczy Leśnictwa w 2009 roku.

Kierownik tematu: W. Chałupka

Na powierzchni doświadczalnej buka w Nadleśnictwie Choczewo wykonano ocenę cechy jakościowych drzewek (prostość pnia, pokrój drzew, podatność na rozwidlenia, wysokość najniższego rozwidlenia, kąt wyrastania gałęzi i grubość gałęzi) według metodyki podanej przez Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych IBL. Dla badanych cech wyliczono średnie blokowe i proveniencyjne, natomiast analizie wariancji poddano średnie wartości cech dla poletek. Spośród wyżej wymienionych sześciu cech jakościowych, tylko dwie cecha - pokrój pnia i grubość gałęzi – różnicowały proveniencje buka istotnie statystycznie.

Istotne zróżnicowanie proveniencji pod względem niektórych obserwowanych cech, wskazuje na możliwość poprawy jakości hodowlanej buka na drodze selekcji międzypopulacyjnej.

## **Realizacja badań naukowych w ramach Sieci Naukowej „Wielkopolskie Centrum Badań Przyrodniczych i Medycznych”**

### **Badania porównawcze metabolizmu nasion buka, jaworu i klonu zwyczajnego w czasie ustępowania spoczynku w warunkach stratyfikacji chłodnej.**

ID PAN– Z. Szczotka, T. Pawłowski; IChB PAN – M. Stobiecki;

Większość nasion drzew strefy umiarkowanej charakteryzuje się spoczynkiem, dla którego przełamania najczęściej niezbędna jest stratyfikacja chłodna. Proces ustępowania spoczynku trwa kilkanaście tygodni, a jego mechanizmy pomimo licznych badań są wciąż nie do końca wyjaśnione. Przeprowadzone badania są kontynuacją prowadzonych w Pracowni Fizjologii Wzrostu i Rozwoju ID PAN studiów nad dynamiką metabolizmu niektórych związków, o których mamy podstawy sądzić, że są związane z mechanizmami ustępowania spoczynku, dostępnymi dla nas metodami. Określenie metabolomu nasion drzew pozwoliłoby na określenie, poprzez śledzenia sekwencji, zmian profili metabolitów w czasie. Celem prowadzonych przez nas badań w tym zakresie było określenie przyczyn i skutków zachodzących procesów metabolicznych prowadzących do ustępowania spoczynku nasion.

Pierwszym obiektem badań, które zostały przeprowadzone w ramach Wielkopolskiej Sieci Naukowej były nasiona klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.). Do określenia profili metabolitów pierwotnych i wtórnych wykorzystano zarodki nasion klonu poddawanych uwodnieniu, stratyfikacji i wystawionych do kiełkowania. Okres w którym analizowano zmiany profilów metabolitów wtórnych wynosił 12 tygodni: od nasion suchych do nasion skiełkowanych. Materiał do analiz pobierano co trzy tygodnie (6 punktów pomiarowych). Każdorazowo do ekstrakcji wykorzystywano 100 mg zarodków. Próbkę w każdym punkcie czasowym były przygotowywane w czterech powtórzeniach. Analizy próbek po blokowaniu grup polarnych w związkach (derywatywacji) wykonywano na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas z analizatorem ToF. W celu uzyskania wiarygodnych wyników pod względem statystycznym, dla każdego punktu pomiarowego analizowano cztery próby biologiczne w dwóch powtórzeniach technicznych (każdorazowo 8 powtórzeń). Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach. W analizowanym materiale zidentyfikowano szereg aminokwasów, wolnych cukrów oraz ich połączeń, nie identyfikowano hormonów roślinnych. Obróbka statystyczna wyników w obu eksperymentach nie wykazała istotnych różnic dla żadnej grupy zidentyfikowanych substancji.

### **Antyoksydacyjna i prooksydacyjna funkcja związków fenolowych w aspekcie zróżnicowanej tolerancji topoli na stres oksydacyjny powodowany przez jony metali ciężkich – badania z wykorzystaniem HPLC-MS i HPLC-UV**

ID PAN – G. Lorenc-Plucińska; IChB PAN – M. Stobiecki

Topolę czarną (*Populus nigra* L.) i czarną amerykańską (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsch.) uprawiano w glebie pobranej ze strefy ochronnej A (w Żukowicach) oraz B (w Bogomicach) Huty Miedzi „Głogów” należącej do KGHM „Polska Miedź” S.A., oraz w glebie z matecznika topolowego „*Populetum*” ID PAN w Kórniku (kontrola). Na podstawie wykonanej analizy mineralnej gleby stwierdzono istotnie wyższe stężenia, zarówno w formie ogólnej jak i przyswajalnej (biodostępnej), Cd, Pb, Zn i Cu w strefie A w Żukowicach niż w strefie B w Bogomicach i w Kórniku (kontrola). Z kolei w Bogomicach wykazano najwyższe stężenia Fe, Cr, Ni i Mn. Stężenia Cu i Pb w

Żukowicach przekraczały krytyczny poziom 125 mg kg<sup>-1</sup> Cu i 400 mg kg<sup>-1</sup> dla Pb, co wskazuje na fitotoksyczność.

Analiza mineralna sadzonek topoli wykazała, że Pb i Cu gromadzone są głównie w korzeniach, Cd przede wszystkim w pędzie nadziemnym, a Zn w podobnych proporcjach w liściach, łodydze i korzeniach. Stężenia Cu i Pb w poszczególnych organach sadzonek przekraczały wartości krytyczne u obu gatunków topoli uprawianych na glebach ze stref ochronnych huty miedzi. Również stężenia Cd i Zn w korzeniach przekraczały wartości krytyczne dla roślin, zwłaszcza w wariantcie uprawy w glebie z Żukowic. *Populus deltoides* charakteryzowała się wyższym stopniem tolerancji na stres metali ciężkich w porównaniu z *P. nigra*.

Analiza związków fenolowych w aspekcie zróżnicowanej tolerancji topoli na stres metali ciężkich obejmowała badania ogólnej zawartości i specyficznych związków fenolowych. Wykazano spadek całkowitej puli związków fenolowych w korzeniach obu topoli uprawianych w glebie ze stref ochronnych huty miedzi, prawdopodobnie w następstwie zwiększonej eksudacji do podłoża i tym samym wzrostu stabilizacji jonów metali ciężkich w ryzosferze (niedostatek środków finansowych na badania uniemożliwił szczegółową weryfikację powyższego stwierdzenia). Pomiary widm absorpcji UV poszczególnych związków fenolowych ekstrahowanych z korzeni drobnych uprawianych topoli nie pozwoliły na ich szczegółową identyfikację z powodu braku odpowiednich widm standardowego. Identyfikację związków przy użyciu technik HPLC/MS<sup>n</sup> przeprowadzono z jedynie dla roślin kontrolnych. Pozostałe warianty badań wymagają dalszych analiz i dodatkowych środków finansowych.

### **Identyfikacja białek uczestniczących w aktywacji procesów tolerancji wybranych gatunków drzew (topole) na stres metali ciężkich – badania z wykorzystaniem techniki spektrometrii masowej MALDI-TOF MS**

ID PAN – G. Lorenc-Plucińska; IChB PAN – M. Stobiecki

Różne gatunki topoli, w tym topolę czarną (*Populus nigra* L.), czarną amerykańską (*P. deltoides* Bartr. ex Marsch.), topole kalifornijską (*P. trichocarpa*) oraz mieszańce topoli czarnej i czarnej amerykańskiej uprawiano w glebie z dodatkiem jonów Cu, Cd i Pb w zakresie stężeń podprogowych, progowych i krytycznych. Wykonano analizę pobierania, translokacji i akumulacji poszczególnych jonów metali w pędzie nadziemnym i korzeniach topoli. Oznaczono całkowitą pulę białek rozpuszczalnych w poszczególnych organach sadzonek topoli, wykonano profile białkowe z wykorzystaniem techniki 2D i podjęto próbę identyfikacji wyselekcjonowanych białek metodą MALDI-TOF-MS.

Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach stresu metali ciężkich następuje nadekspresja białek peroksydaz, HSP, oraz PR. Prace wymagają dalszej kontynuacji i przede wszystkim dodatkowych środków finansowych na ich realizację.

### **Gospodarka wodna w spoczynkowych pąkach świerka pospolitego – badania z wykorzystaniem tomografii magnetyczno-rezonansowej**

ID PAN- M. Guzicka, W. Chałupka, IFM PAN-J. Kowalczyk, J. Trit-Goc

W ramach współpracy z zespołem Środowiskowego Laboratorium Badań Radiospektroskopowych w Instytucie Fizyki Molekularnej PAN prowadzono dalsze badania gospodarki wodnej w pąkach świerka pospolitego podczas wiosennej aktywacji

pąków. Wyniki uzyskane metodą tomografii magnetyczno-rezonansowej skorelowano ze zmianami strukturalnymi pąków określonymi na podstawie obserwacji centralnych przekrojów podłużnych przez zawiązek pędu w mikroskopach świetlnym, konfokalnym oraz transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Izolowane z pąków zawiązki pędu zostały utrwalone (w zależności od typu mikroskopu stosowano FAA, CrAF lub GA+PFA) i poddane odpowiedniej obróbce mikrotechnicznej.

W doświadczeniu użyto spektrometru Bruker Avance 300 MHz, a analizy parametrów wody przeprowadzono w oparciu o centralne przekroje podłużne (grubość obrazowanej warstwy wynosiła 370  $\mu\text{m}$ ). Pomiarów wykonywano zawsze w temperaturze  $+21^{\circ}\text{C}$ , w czterech rejonach anatomicznych zawiązków pędu: 1 - wiązki przewodzące poniżej diafragmy węzłowej zawiązka pędu, 2 - prokambium osiowej części zawiązka pędu, 3 - centralna część parenchymatycznego rdzenia i 4 - merystem wierzchołkowy. Uzyskano obrazy charakteryzujące się wysoką rozdzielczością, umożliwiającą precyzyjną identyfikację tych rejonów (w badanym okresie rozwojowym wysokość zawiązka pędu wynosiła ok. 1mm).

W badanym okresie rozwojowym nie stwierdzono obecności wiązek przewodzących w zawiązkach pędów, co oznacza, iż obserwowane zmiany nie były wynikiem wykształcenia cewek i podjęciem aktywnego transportu wody w zawiązku. Zmiany parametrów wody w badanym okresie przebiegały w sposób stopniowy i ciągły. Stwierdzono jednak zróżnicowane ich tempo w różnych rejonach anatomicznych zawiązka. Najszybciej zmieniała się charakterystyka wody w obrębie merystemu wierzchołkowego (jednocześnie wzrastała w komórkach liczba wakuol), najwolniej w prokambium. Zmiany te były zgodne z kierunkiem rozwojowym tych rejonów.

**BLP-281. Program testowania potomstwa WDN, DD, PN, PUN w ramach «Programu zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych na lata 1991-2010».**

Kierujący: W. Chałupka

Wykonywali: W. Chałupka, R. Rożkowski, M. Guzicka, H. Przybył

W bieżącym roku sprawozdawczym pracownicy Pracowni Genetyki Populacyjnej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku dokonali oceny przeżywalności sadzonek po dwóch sezonach wegetacyjnych oraz konsultowali z pracownikami Nadleśnictwa niezbędne prace pielęgnacyjne na powierzchniach testujących populacje i drzewa mateczne buka zwyczajnego. na terenie Nadleśnictwa Okonek.

Przeciętna przeżywalność na powierzchni doświadczalnej testującej potomstwo z drzewostanów matecznych wyniosła 93,0%. Najwyższą przeżywalnością charakteryzowała się populacja nr 791 (Kartuzy) – 98,0 %, natomiast najniższą przeżywalnością cechowały się dwie populacje: 832 (Tomaszów Lub.) – 88,7% oraz 584 (Czersk) – 88,8%. Standard lokalny nr 658 (Okonek) oraz standard krajowy nr 751 (Kwidzyn) osiągnęły wartości w pobliżu średniej dla całej powierzchni doświadczalnej, odpowiednio 92,5% i 93,8%.

Na powierzchni testującej potomstwo drzew matecznych (rody) buka pospolitego, oprócz oceny przeżywalności, sprawdzano zgodność miejsca posadzenia sadzonek z lokalizacją na planie i dokonano weryfikacji wiosennych poprawek. Po uzupełnieniu luk sadzonkami z rezerwy zgodnie z przyjętymi założeniami programu testowania, pozostało na powierzchni łącznie 7351 sztuk sadzonek, tj. 99,4% początkowego stanu liczbowego.

**BLP-304. Populacyjna zmienność buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) w Polsce (wzrost i rozwój w okresie młodnika)**

Kierujący: W. Chałupka

Wykonywali: W. Chałupka, R. Rożkowski, M. Guzicka, A. Misiorny, H. Przybył

Na powierzchni doświadczalnej buka w Nadleśnictwie Choczewo wykonano ocenę cechy jakościowych drzewek (prostość pnia, pokrój drzew, podatność na rozwidlenia, wysokość najniższego rozwidlenia, kąt wyrastania gałęzi i grubość gałęzi) według metodyki podanej przez Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych IBL. Dla badanych cech wyliczono średnie blokowe i proveniencyjne, natomiast analizie wariancji poddano średnie wartości cech dla poletek. Spośród wyżej wymienionych sześciu cech jakościowych, tylko dwie cecha - pokrój pnia i grubość gałęzi – różnicowały proveniencje buka istotnie statystycznie.

Istotne zróżnicowanie proveniencji pod względem niektórych obserwowanych cech, wskazuje na możliwość poprawy jakości hodowlanej buka na drodze selekcji międzypopulacyjnej.

Mechanizmy związane z utratą odporności na desykcję w kiełkujących nasionach oraz czynniki wpływające na przywrócenie odporności badano na nasionach wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta*) jako obiekcie modelowym. Dojrzałe nasiona wyki zebrane w roku 2008, podsuszone do 5% zawartości wody i przechowywane przez 3 miesiące poddano imbibicji. Nasiona po 0h, 24h, 48h oraz 72h kiełkowania poddano czterem wariantom traktowania: kontrola- nasiona nie podsuszane, D –suszone nad roztworem NaCl, PEG – inkubowane w glikolu polietylenowym (potencjał osmotyczny - 1,7 MPa ), PEG+D – inkubowane w PEG i suszone. Suszenie odbywało się przez ten sam okres czasu. Odporność na desykcję (DT) mierzono jako zdolność do kiełkowania lub kontynuacji kiełkowania po uprzednim suszeniu. Suszenie nasion po imbibicji (0h) do poziomu 0,13 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW nie obniżało ich zdolności do kiełkowania. Nasiona z korzonkiem zarodkowym 10 mm i dłuższym stopniowo traciły zdolność do kontynuacji kiełkowania po podsuszaniu. W nasionach po 48h kiełkowania, inkubowanych w PEG podsuszonych (PEG+D) zaobserwowano przywrócenie zdolności kiełkowania (powyżej 75% w stosunku do kontroli - 20%). Najwyższą wartość wypływu elektrolitów (E) zanotowano dla nasion w 72h kiełkowania, w wariacie D, kiedy zdolność nasion do kontynuacji kiełkowania nie przekraczała 9%. Znaczaco niższy E zaobserwowano w nasionach PEG+D (o ok. 30%). Niezależnie od sposobu traktowania nasion odnotowano wzrost poziomu aldehydu malonowego (MDA), który był silnie skorelowany z DT (r=0,92) podobnie jak E (r=0,86). W nasionach wyki stwierdzono obecność dwóch termostabilnych białek dehydrynowych o masie 32kDa and 46kDa. Suszenie nasion na różnych etapach kiełkowania powodowało wzrost zawartości białka 32kDa. Najsilniej skorelowane z DT były zmiany w poziomie białka 32kDa w nasionach PEG+D (r=0,99).

Zmiany w poziomie białka 46kDa pojawiły się w nasionach D oraz PEG, gdzie każdy stosowany typ traktowania spowodował wzrost zawartości o 20% w porównaniu do kontroli. Dodatkowo w nasionach PEG+D (24h kiełkowania) wykazano, iż poziom białek dehidrynowych był tak samo wysoki jak w nasionach suchych. Wysoki poziom nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) oraz anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) podczas podsuszania wskazywał na występowanie stresu oksydacyjnego. Jednakże znacząco niższy poziom  $O_2^{\cdot-}$  wykazano w nasionach inkubowanych w PEG. Synteza kwasu askorbinowego (ASA) została zainicjowana po imbibicji nasion. Nasiona nie traktowane (kontrola) charakteryzowały się niską zawartością formy utlenionej ASA, kwasu dehydroaskorbinowego (DHA), oraz wysoką wartością stosunku ASA/DHA wskazującego na wysoki potencjał redox w komórkach. W nasionach podsuszanych zawartość ASA wzrastała a najwyższą zawartością tego związku charakteryzowały się nasiona inkubowane w PEG. W tych nasionach również poziom DHA był najwyższy, oraz aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX). Silna korelacja pomiędzy aktywnościami katalazy (CAT) oraz peroksydazy gwajakolowej (POX) a zawartościami  $H_2O_2$  wskazuje, że enzymy te aktywnie usuwają reaktywne formy tlenu. Spadek aktywności CAT wskazuje, że działa ona efektywniej niż POX i reduktaza glutationowa GR. Ponadto, w nasionach podsuszonych, spadek aktywności APX był silnie skorelowany z poziomem  $H_2O_2$ , syntezą DHA oraz recykлизacją ASA ( $r=0,96$ ,  $r=1$ ,  $r=1$  odpowiednio).

Podsumowując, wykazano istotny związek wszystkich analizowanych parametrów z utratą lub przywracaniem odporności na desykcję w kiełkujących nasionach wyki, szczególnie wyraźny dla reaktywnych form tlenu oraz usuwających je antyoksydantów.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

## **Publikacje**

25 26 27 28 29 30 59