

Załącznik 2

Dr inż. Wojciech Kraj

## Autoreferat

Zakład Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew

Instytut Ochrony Ekosystemów Leśnych

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, maj 2017

**1. Imię i nazwisko:** Wojciech Kraj

**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

2.1. **Wykształcenie średnie**, I Liceum Ogólnokształcące im. Bartłomieja Nowodworskiego w Krakowie

2.2. **Magister inżynier ogrodnictwa**, specjalizacja rośliny ozdobne, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 1988

Tytuł pracy: „Próby rozmnażania *Lilium martagon* L. metodą kultur tkankowych”

Promotor: Dr Stanisław Ślusarek

Recenzent: Prof. dr hab. Edward Pojnar

2.3. **Doktor nauk leśnych**, specjalność naukowa: fizjologia i genetyka drzew, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Leśny, 1997

Tytuł pracy: „Określenie zróżnicowania genetycznego wybranych proveniencji świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.) na podstawie polimorfizmu genomowego DNA”

Promotor: Prof. dr hab. Adam Dolnicki

Recenzci: Prof. dr hab. Maciej Giertych

Prof. dr hab. Franciszek Dubert

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu**

3.1. 1988-1989 - asystent w Katedrze Fizjologii Roślin na Wydziale Ogrodniczym Akademii Rolniczej w Krakowie

3.2. 1989-1998 - asystent w Katedrze Szczegółowej Hodowli Lasu w zespole dydaktycznym Fizjologii Roślin Drzewiastych

3.3. 1998-2004- adiunkt w Zakładzie Fizjologii Drzew Leśnych Wydziału Leśnego Akademii Rolniczej w Krakowie

3.4. 2004-2008- adiunkt w Katedrze Fitopatologii Leśnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

3.5. Od 2008- starszy wykładowca w Katedrze Fitopatologii Leśnej/Zakładzie Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

#### 4. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

Moje zainteresowania naukowe obejmują dwa główne kierunki badań: fizjologię i biochemię drzew oraz badania w zakresie oceny bioróżnorodności gatunków drzew leśnych i grzybów. Moja działalność naukowa nie ogranicza się do wąskiej obszar, ale staram się rozwiązywać problemy naukowe w szerszym zakresie biorąc pod uwagę zarówno cechy fizjologiczne i biochemiczne organizmów jak i ich zróżnicowanie genetyczne. Od początku pracy na Akademii Rolniczej/Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie zajmuję się badaniem cech fizjologicznych i biochemicznych fenologicznych form buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.). Przedmiotem tych badań były różnice między formami fenologicznymi w zakresie morfologii liści, mrozoodporności i jesiennego starzenia liści. Przeprowadziłem również badania w zakresie oceny wewnątrz i międzypopulacyjnej zmienności genetycznej form fenologicznych buka. W zakresie drugiego kierunku moich zainteresowań naukowych - bioróżnorodności drzew leśnych i grzybów zrealizowałem projekt naukowy dotyczący zmienności genetycznej proveniencji świerka pospolitego (*Picea abies* Karst. L.) oraz przeprowadziłem badania zmienności grzybów powodujących zamieranie pędów i igieł sosny. Moja praca doktorska oparta na badaniu zmienności proveniencji świerka pospolitego przy użyciu markerów molekularnych była jednym z pierwszych takich projektów naukowych w leśnictwie realizowanych w Polsce. Ważnym zagadnieniem naukowym, które mnie interesowało i które realizowałem we współpracy z Panem Profesorem Tadeuszem Kowalskim było zamieranie jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.). W ramach realizowanego grantu uzyskanego w roku 2009 z Narodowego Centrum Nauki (NCN) i prac zleconych przez Dyрекję Generalną Lasów Państwowych zajmowałem się bioróżnorodnością i molekularną identyfikacją grzybów uczestniczących w zamieraniu jesionu, biochemicznymi podstawami zróżnicowanej odporności osobników jesionu na infekcję i dalszy przebieg choroby, a także poszukiwaniem markerów molekularnych pozwalających na selekcję bardziej odpornych na chorobę osobników. W większości badań dotyczących bioróżnorodności organizmów jednym z istotnych celów prac była

ocena wpływu warunków klimatycznych terenów pochodzenia roślin i grzybów na kształtowanie poziomu zmienności genetycznej.

Osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej obejmują 36 opublikowane prace naukowe (w tym referaty naukowe wygłoszone na konferencjach) i 11 prezentacji na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Spośród wymienionych prac w języku angielskim ukazało się 28 prac naukowych i 7 prezentacji na konferencjach. W następujących czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (dane z 2016 roku) ukazało się 22 prace naukowe: *Acta Biologica Cracoviensia*, *Acta Physiologiae Plantarum*, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *Annals of Forest Science*, *Dendrobiology*, *European Journal of Forest Research*, *Forest Pathology*, *Journal of Phytopathology*, *Journal of Plant Nutrition*, *Journal of Plant Pathology*, *Mycological Progress*, *Plant Pathology*, *Sylvan*. Poza wymienionymi czasopismami moje prace zostały opublikowane w następujących czasopismach krajowych: *Acta Agraria et Silvestria*, *Series Silvestris*, *Acta Agrobotanica*, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, *Phytopathologia Polonica*. Większość opublikowanych przeze mnie prac jest oryginalnymi pracami naukowymi. Zarówno prace dotyczące fizjologii i biochemii drzew jak i prace z zakresu bioróżnorodności drzew leśnych i grzybów oparte są na bogatym materiale doświadczalnym. Zdecydowana większość artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach indeksowanych i nieindeksowanych w bazie JCR oraz monografii i wygłoszonych na konferencjach referatów (25) to prace gdzie jestem pierwszym autorem i z wyjątkiem jednej pracy autorem korespondentem (69%), natomiast w 10 pracach (28%) jestem jedynym autorem. Brałem udział w 14 konferencjach naukowych w tym 11 międzynarodowych, na których byłem autorem lub współautorem 5 referatów i 11 posterów.

Odbyłem liczne staże naukowe i szkolenia dzięki czemu opanowałem metody eksperymentalne w zakresie kultur tkankowych roślin, mrozoodporności drzew, biochemii i badania zmienności genetycznej organizmów. Brałem również udział w kursie organizowanym przez MBS - Serwis dla Biologii Molekularnej (obecnie MBS - Szkolenia, Konferencje, Usługi Sp. z o.o.) pt: "Podstawy techniki Real Time PCR i analiza ekspresji genów" i odbyłem staż naukowy w zakresie biochemii i biologii molekularnej białek, badania ekspresji genów oraz metod klonowania genów. Udział w wymienionych stażach, szkoleniach i licznych warsztatach naukowych pozwoliły na podnoszenie moich kwalifikacji w zakresie fizjologii, biochemii i biologii molekularnej

oraz na opanowanie metod stosowanych w prowadzonych przeze mnie badaniach. W latach 2012 – 2015 byłem członkiem Komitetu Zarządzającego (MC Member) akcji COST nr FP1103 pt: „Fraxinus dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management (FRAXBACK)” i brałem udział w międzynarodowych spotkaniach i konferencjach w Belgii (2012), na Litwie (2012, 2014), w Czechach (2014), Szwecji (2013), Chorwacji (2015), Irlandii (2013), Niemczech (2013). Podczas tych spotkań prezentowałem wyniki badań uzyskiwanych w ramach grantu NCN i pracy zleconej przez Dyрекcyję Generalną Lasów Państwowych dotyczących zamierania jesionu w Polsce, genetycznej zmienności sprawcy choroby – *Hymenoscyphus fraxineus* i biochemicznych podstaw zróżnicowanej odporności osobników jesionu na infekcję. Brałem również udział w dyskusjach mających na celu ocenę i planowanie kolejnych celów funkcjonowania sieci.

Recenzowałem 9 artykułów w czasopismach naukowych, z których większość jest indeksowana w bazie JCR (*Annals of Forest Science, Dendrobiology, Fungal Ecology, Forest Pathology, Canadian Journal of Forest Research*).

Byłem kierownikiem w dwóch i głównym wykonawcą w trzech projektach badawczych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych (KBN) i Narodowe Centrum Nauki (NCN) oraz wykonawcą w dwóch projektach badawczych zleconych przez Dyрекcyję Generalną Lasów Państwowych. W prawie wszystkich projektach naukowych, w których byłem wykonawcą realizowałem oddzielne zadania badawcze. W latach 2004 – 2015 jako kierownik projektu lub główny wykonawca wziąłem więc udział w siedmiu projektach badawczych, z których każdy trwał co najmniej trzy lata. Otrzymałem również stypendia JM Rektora Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie na badania naukowe, z których zrealizowana została część pracy doktorskiej i badania dotyczące wewnątrzpopulacyjnej zmienności fenologicznych form buka zwyczajnego.

Zbiorcze zestawienie dorobku naukowego z podziałem na poszczególne formy aktywności przedstawiono w tabeli. (Szczegółowy wykaz publikacji naukowych zamieszczony jest w załączniku 4 i 6)

Rodzaj publikacji/aktywności	Przed doktoratem		Po doktoracie		Łącznie	
	Liczba	Punkty* MNiSW	Liczba	Punkty* MNiSW	Liczba	Punkty* MNiSW
Artykuły w czasopismach indeksowanych w bazie JCR			20	384	20	384
Artykuły w czasopismach nieindeksowanych w bazie JCR	2	12	7	27	9	39
Monografie i rozdziały w monografiach			2	8	2	8
Referaty naukowe wygłoszone na Konferencjach	2		3		5	
Pozostałe komunikaty prezentowane na Konferencjach	4		7		11	
Sprawozdania z realizacji projektu			3		3	
Recenzje			9		9	
RAZEM	8	12	51	419	59	431
RAZEM z pominięciem prac zgłaszanych jako osiągnięcie	8	12	46	314	54	326
Sumaryczny IF z roku wydania publikacji			19.911		19,911	
Liczba publikacji (1 autor)			13	138	13	138
Liczba publikacji współautorskich (2 autorów)	4		16	156	20	156
Liczba publikacji współautorskich (3 autorów)	4	12	10	125	14	137

\* - Liczba punktów obliczona wg. listy czasopism punktowanych z roku opublikowania artykułu lub dla wcześniej opublikowanych artykułów wg. najwcześniejszej dostępnej listy czasopism

Zestawienie cytowań (wg. Web of Science na dzień 25.05.2017)

Kategoria	Ogółem
Liczba prac w bazie Web of Science*	20
Liczba cytowań	86
Liczba cytowań (bez autocytowań)	62
Liczba artykułów cytujących	68
Średnia liczba cytowań jednego artykułu	4.78
Indeks Hirsch'a (H)	5

\* - uwzględniono dwie publikacje z numerem DOI ze statusem „early view”

Kowalski T., Bilański P., **Kraj W.** 2017. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology DOI: 10.1111/ppa.12667.

**Kraj W.** 2017. The effect of carbon/nitrogen imbalance on leaf senescence induction in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 59(1). DOI: 10.1515/abcsb-2016-0022.

**5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Biochemiczne podstawy zróżnicowanego terminu indukcji i przebiegu starzenia liści fenologicznych form buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)

5.2. Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

- a. Kraj W. (2014) Proteolytic activity and nitrogen remobilisation in senescing leaves of phenological forms of *Fagus sylvatica*. *Dendrobiology* 72: 163-176.
- b. Kraj W. (2015) Chlorophyll degradation and the activity of chlorophyllase and Mg-dechelataze during leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. *Dendrobiology* 74: 43-57.
- c. Kraj W. (2016) Reactive oxygen species and antioxidant levels as the factors of autumn senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 32.
- d. Kraj W. (2017) Antioxidative enzyme activity as the factor causing differential autumn senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 16.
- e. Kraj W (2017) Stem girdling affects the carbon/nitrogen imbalance and oxidative stress, and induces leaf senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 59(1), DOI: 10.1515/abcsb-2016-0022.

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 4.992

Suma punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 105



### 5.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### **Wprowadzenie**

Naturalne starzenie jest końcową fazą rozwoju liści, która decyduje o długości ich życia. Jest to proces kontrolowany genetycznie i skoordynowany na poziomie komórki, organu i całej rośliny. Składa się z serii biochemicznych procesów, podczas których organelle, błony komórkowe i makrocząsteczki komórkowe są degradowane a produkty tych reakcji takie jak aminokwasy, cukry i jony mineralne są eksportowane ze starzejących się liści i gromadzone w pędach lub korzeniach i wykorzystywane do wzrostu drzew w następnym okresie wegetacji (Buchanan-Wollaston 2003; Lim 2007; Keskitalo 2005). Jedną z głównych fizjologicznych funkcji starzenia liści jest resorpcja i remobilizacja makrocząsteczek komórkowych. Mechanizmy regulujące redystrybucję składników pokarmowych i asymilatów w czasie starzenia liści i decydujące o długości ich życia kontrolują wydajność remobilizacji tych składników w obrębie rośliny. Głównym pierwiastkiem podlegającym procesowi remobilizacji jest azot (Himmelblau, Amasino 2001; Guiboileau i in. 2010). Procesy biochemiczne zachodzące w czasie starzenia liści drzew klimatu umiarkowanego prowadzą zwykle do resorpcji co najmniej 50% azotu w nich zgromadzonego. Jest on głównym pierwiastkiem ograniczającym produktywność naturalnych ekosystemów leśnych i wpływającym na wzrost drzew, w tym buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) (Marschner 1995; Rennenberg i in. 1998). Zasadniczym czynnikiem wpływającym na wydajność remobilizacji jest termin indukcji i długość procesu starzenia liści (Fracheboud i in. 2009). Wpływają one na wzrost osobników buka w następnym okresie wegetacji. Drzewa stosują różne strategie, które kontrolują termin indukcji i szybkość starzenia liści. Są one głównie oparte na zapewnieniu odpowiedniej równowagi hormonalnej, modyfikacji procesów metabolicznych i kontroli poziomu reaktywnych form tlenu (Juvany i in. 2013; Zimmermann, Zentgraf 2005). Strategie adaptacyjne gatunków odnośnie terminu indukcji jesiennego starzenia liści mają więc zasadnicze znaczenie dla kształtowania się równowagi między gromadzeniem asymilatów i remobilizacją azotu i innych składników mineralnych. W związku z tym proces starzenia liści drzew, a przede wszystkim termin jego indukcji musi podlegać ścisłej kontroli. Starzenie liści kontrolowane jest z jednej strony przez mechanizmy uwarunkowane genetycznie i decydujące o biochemicznych i molekularnych procesach zachodzących w komórkach liści, natomiast z drugiej przez czynniki zewnętrzne (głównie

fotoperiod i temperaturę), na które w specyficzny sposób reagują poszczególne gatunki drzew (Menzel 2003; Delpierre i in. 2009; Schuster i in. 2014). Prowadzi to do charakterystycznego dla gatunków terminu występowania i kolejności biochemicznych procesów starzenia, w tym gospodarowania składnikami mineralnymi i asymilatami, remobilizacją i zapewniania warunków do optymalnego wzrostu drzew w zmiennym środowisku.

Mimo znaczenia procesu jesiennego starzenia liści drzew, w tym procesu resorpcji, a następnie gromadzenia i remobilizacji składników pokarmowych, dla ich dalszego wzrostu i rozwoju poziom wiedzy o czynnikach indukujących i modyfikujących ten proces jest ograniczony. Większość badań dotyczących starzenia liści została przeprowadzona na roślinach jednorocznych takich jak: *Arabidopsis*, pszenica czy ryż. Jesienne starzenie liści u gatunków drzew klimatu umiarkowanego zachodzi w większości przypadków we wrześniu i październiku a termin indukcji dla gatunku oraz kolejność zachodzenia biochemicznych procesów starzenia z roku na rok wykazują małe zróżnicowanie (Vitasse i in. 2009).

Buk zwyczajny (*Fagus sylvatica* L.) jest jednym z najważniejszych, lasotwórczych gatunków liściastych występujących w Polsce i Europie Środkowo-Wschodniej. Zajmuje zróżnicowane środowiska: od ostrego charakterystycznego dla klimatu górskiego do łagodnego występującego na nizinach o klimacie wilgotnym, zbliżonym do morskiego. Zmienne warunki klimatyczne i środowiskowe skutkują dużym zróżnicowaniem występowania wiosennych i jesiennych faz fenologicznych i zmiennością cech genetycznych (Kraj, Sztorc 2009), morfologicznych (Dolnicki, Kraj 2001), fizjologicznych i biochemicznych między populacjami i wewnątrz populacji buka przystosowujących ten gatunek do życia w zmiennych warunkach. Na podstawie tych cech wyróżniono formy fenologiczne buka (Dolnicki, Kraj 2001; Stachak 1965; Hejtmánek 1956). Formy te różnią się terminem wiosennego rozwoju pąków i jesiennego starzenia liści zarówno między populacjami jak i między osobnikami wewnątrz poszczególnych populacji. Różnice te wewnątrz populacji dochodzą nawet do kilkunastu dni (Dolnicki, Kraj 2001). Tak duże zróżnicowanie terminów początku i końca wzrostu, i występowanie fenologicznych form buka jest jedną ze strategii zapewniających temu gatunkowi wzrost w zmiennych, a szczególnie w niekorzystnych warunkach środowiska, zwłaszcza w przypadku występowania wiosennych i jesiennych przymrozków (Dolnicki, Kraj 2001; Kraj, Sztorc 2009).

Morfologiczne (Dolnicki, Kraj 2001), fizjologiczne (Dolnicki, Kraj 2001; Dolnicki, Kraj 1999) i genetyczne (Kraj, Sztorc 2009) zróżnicowanie osobników buka opisane w poprzednich badaniach i wynikające z niego ich fenologiczne cechy, a także niewielka wiedza

na temat kontroli i regulacji procesu starzenia liści buka zwyczajnego, były podstawą podjęcia badań dotyczących biochemicznych podstaw procesu starzenia i mechanizmów jego kontroli. Wyniki tych badań będą mogły być wykorzystane w przyszłych, planowanych pracach mających na celu zidentyfikowanie genów i alleli regulujących proces starzenia liści buka i powodujących różnice fenologiczne między osobnikami i populacjami. Badania zostały przeprowadzone na grupach osobników różniących się cechami fenologicznymi wybranych na podstawie kilkuletnich obserwacji daty i szybkości żółknięcia liści przy zastosowaniu skali opracowanej przez Stachak (1965; Kraj 2014).

**Celem naukowym podjętych badań było:**

1. Określenie wpływu czynników zewnętrznych na indukcję jesiennego starzenia liści buka zwyczajnego. Głównymi czynnikami, które wywołują starzenie liści drzew są skracający się fotoperiod i obniżająca się temperatura (Delpierre i in. 2009; Schuster i in. 2014). Badania miały na celu określenie wpływu fotoperiodu i zmian temperatury oraz interakcji między tymi czynnikami na proces indukcji i przebieg starzenia liści.
2. Charakterystyka sekwencji i natężenia biochemicznych procesów zachodzących w poszczególnych etapach starzenia oraz wpływu cech fenologicznych osobników buka na termin występowania i przebieg tych etapów.
3. Określenie biochemicznych podstaw zróżnicowanego terminu indukcji, a następnie różnej szybkości przebiegu starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi (form fenologicznych).
4. Ocena udziału zaburzeń równowagi między powstawaniem aktywnych form tlenu a aktywnością systemu antyoksydacyjnego na indukcję i przebieg starzenia liści u form fenologicznych. Określenie związku między cechami fenologicznymi osobników buka a ich zdolnością do przeciwdziałania skutkom stresu oksydacyjnego i związanym z nim terminem indukcji procesu starzenia liści. Ocena udziału poszczególnych składników systemu antyoksydacyjnego liści w powstawaniu odporności na wzrost zawartości aktywnych form tlenu i kontrolę przebiegu starzenia u fenologicznych form buka.
5. Określenie wpływu terminu indukcji i szybkości zachodzenia starzenia liści na stopień resorpcji białek i azotu u fenologicznych form buka. Ocena związku między fenologicznymi cechami osobników buka i charakterystycznymi dla nich zmianami

aktywności różnych klas peptydaz a dynamiką degradacji białek i wydajnością remobilizacji azotu.

6. Ocena wpływu zaburzeń transportu asymilatów oraz gromadzenia węglowodanów i powstającej nierównowagi metabolizmu węgla i azotu na indukcję starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi. Określenie wpływu tych zmian na wzrost produkcji aktywnych form tlenu, zaburzenie stanu redoks komórek i modyfikację aktywności systemu antyoksydacyjnego zapewniającego różny stopień ochrony przed stresem oksydacyjnym i wpływającego na starzenie liści.

### **Metodyka badań**

Cele 1-5 projektu badawczego zrealizowano na powierzchniach doświadczalnych zlokalizowanych w nadleśnictwie Krzeszowice koło Krakowa obejmujących kilkunastoletnie buki (Kraj 2014, 2015, 2016, 2017a), natomiast cel 6 w doświadczeniu przeprowadzonym w warunkach częściowo kontrolowanych na kilkuletnich roślinach buka uprawianych w sztucznym podłożu (Kraj 2017b). Dla identyfikacji grup osobników buka różniących się jesiennymi fazami fenologicznymi w latach 2004-2008 na dwóch powierzchniach doświadczalnych obserwowano osobniki buka i zgodnie ze skalą opracowaną przez Stachak (1965) oceniano zmiany procentowego udziału starzejących się liści (Kraj 2014, 2015). Osobniki buka zakwalifikowano do trzech grup: wczesnej, pośredniej i późnej różniących się terminem indukcji i szybkością zachodzenia procesu starzenia liści (Kraj 2014, 2015). Dla zrealizowania celów projektu dla każdej formy fenologicznej pobierano liście z 15 osobników buka w ciągu dwóch lat w 8-10 terminach w okresie od końca lipca (połowy sierpnia) do końca października (terminu opadania liści w latach ich zbioru).

Dla określenia terminu indukcji i szybkości przebiegu starzenia liści fenologicznych form buka oraz charakterystyki jego etapów oznaczano zawartość chlorofilu i białek - biochemicznych markerów starzenia (Kraj 2014, 2015). Określono długości fotoperiodu, przy którym następuje indukcja starzenia i wpływ wysokości temperatury na jego przebieg. Degradację chlorofilu w poszczególnych etapach starzenia, jej zależność od temperatury i aktywność *in vivo* enzymów degradujących chlorofil analizowano przez określenie zawartości produktów jego degradacji: chlorofilidu a, chlorofilidu b i feofityny (Kraj 2015). Przeprowadzono również analizę *in vitro* aktywności chlorofilazy i Mg-dechelatazy - enzymów biorących udział w początkowych etapach degradacji chlorofilu.

Celem określenia wpływu nierównowagi między zwiększonym powstawaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i zmniejszającymi się zdolnościami systemu antyoksydacyjnego liści buka do ich usuwania w miarę postępu procesu starzenia oznaczono dynamikę zawartości jonu nadadtlenkowego i nadttlenku wodoru oraz zawartość MDA - miary peroksydacji lipidów (Kraj 2016). Kwalifikację osobników buka do odpowiednich form fenologicznych i zbiór liści przeprowadzono w sposób opisany wcześniej (Kraj 2014, 2015). Wzrost zawartości jonu nadadtlenkowego, nadttlenku wodoru i MDA określono metodami biochemicznymi (Kraj 2016). Dla jonu nadadtlenkowego i nadttlenku wodoru zastosowano również metody histochemiczne (Kraj 2017a). Aktywność systemu antyoksydacyjnego u poszczególnych form fenologicznych określono przez analizę zmian zawartości drobnocząsteczkowych antyoksydantów: kwasu askorbinowego (AsA+DHA) i glutationu (GSH+GSSG) oraz udziału procentowego utlenionej formy tych związków (DHA i GSSG) w całkowitej ich zawartości (Kraj 2016). Aktywność enzymatycznej części systemu antyoksydacyjnego analizowano przez pomiar aktywności katalazy, dysmutazy nadadtlenkowej oraz enzymów cyklu Foyer-Halliwell-Asada: peroksydazy askorbinianowej (APX), reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR), reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR) i reduktazy glutationowej (GR) (Kraj 2017a). Zmiany aktywności systemu antyoksydacyjnego analizowano w trakcie faz starzenia liści określonych na podstawie poziomu zawartości chlorofilu i białek (Kraj 2016, 2017a).

Wpływ terminu indukcji i szybkości starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi na stopień resorpcji związków azotowych oceniono przez analizę zmian zawartości białek i aminokwasów oraz azotu i węgla w starzejących się liściach (Kraj 2014). U wyróżnionych form fenologicznych analizowano zawartość białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, aminokwasów, szybkość degradacji i wydajność remobilizacji tych białek oraz aktywność biorących udział w tym procesie trzech klas enzymów proteolitycznych: aminopeptydaz, karboksypeptydaz i endopeptydaz. Analizowano również zmiany zawartości całkowitego azotu i współczynnika C/N podczas procesu starzenia liści.

Wpływ zaburzeń transportu asymilatów, gromadzenia węglowodanów i powstawania nierównowagi metabolizmu węgla i azotu na indukcję starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi badano na 5-letnich drzewach buka uprawianych w sztucznym podłożu (Kraj 2017b). Celem wywołania zaburzeń transportu związków organicznych z liści w połowie sierpnia 5-roku uprawy roślin dla każdej formy fenologicznej

przeprowadzono zabieg obrączkowania pędów. Polegał on na usunięciu 10 mm paska kory z pędów roślin. Zbiór liści przeprowadzono w dniu obrączkowania oraz po 8, 16, 23 i 35 dniach od tego zabiegu.

Starzenie liści wywołane zabiegiem obrączkowania i zaburzeniami w eksporcie węglowodanów i innych związków z liści oraz różnice reakcji form fenologicznych buka na te zmiany określono przez analizę zmian zawartości chlorofilu i karotenoidów. W celu charakterystyki zmian metabolizmu węgla i azotu przeprowadzono analizę zawartości gromadzonych w liściach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych węglowodanów oraz całkowitego węgla i azotu. Zmiany stanu redoks liści analizowano przez określenie zawartości markerów stresu oksydacyjnego: nadtlenku wodoru i stopnia peroksydacji lipidów. Reakcję obronną systemu antyoksydacyjnego liści form fenologicznych buka na wywołany stres oksydacyjny scharakteryzowano przez określenie aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy askorbinianowej.

### **Podsumowanie wyników badań**

Analiza wpływu głównych czynników zewnętrznych decydujących o terminie indukcji jesiennego starzenia liści oraz cech fenologicznych osobników buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) dowodzi, że decydującym czynnikiem indukującym i regulującym proces jesiennego starzenia liści tego gatunku jest spadek temperatury występujący przy fotoperiodzie około 13 godzin (Kraj 2015). Wykazano, że nawet duży spadek temperatury przy dłuższym fotoperiodzie nie powoduje indukcji starzenia liści. Początek starzenia uzależniony jest od daty spadku temperatury w danym okresie wegetacyjnym, przy czym postęp tego procesu jest wysoce skorelowany z jej przebiegiem. Na podstawie analizy zawartości biochemicznych markerów starzenia liści – chlorofilu (Kraj 2015) i białek (Kraj 2014) - stwierdzono, że starzenie liści buka zachodzi w dwóch lub trzech fazach w zależności od fenologicznych cech osobników. U wczesnej formy fenologicznej degradacja chlorofilu zachodzi w trzech fazach: dwie fazy szybkiego spadku zawartości barwnika przedzielone są fazą wolnego spadku lub stabilnej zawartości chlorofilu związanej ze wzrostu temperatury. Wymienione fazy starzenia są mniej widoczne u pośredniej formy fenologicznej, natomiast u formy późnej występują dwie fazy degradacji chlorofilu: faza stopniowego spadku zawartości we wrześniu i szybkiego spadku od początku października. Forma późna nie wykazuje pośredniej fazy degradacji chlorofilu (Kraj 2015). Końcowa faza degradacji barwnika u wszystkich form fenologicznych była nieodwracalna nawet w przypadku wzrostu

temperatury. W fazie tej wpływ temperatury na zróżnicowaną reakcję form fenologicznych był znacznie mniejszy w porównaniu do wcześniejszych faz starzenia (Kraj 2015). Wydaje się, że odmienna reakcja osobników buka na temperaturę we wrześniu (w początkowych fazach starzenia) i w październiku (w końcowej fazie starzenia) wynika z przechodzenia przez buka przez dwa progi fotoperiodyczne: jeden na początku września (około 13 h) i drugi na początku października (Kraj 2015).

Daty początku faz starzenia, szybkość ich przebiegu i długość życia liści były ściśle związane z występowaniem nagłych spadków temperatury i wrażliwością poszczególnych form fenologicznych na jej zmiany. Początek pierwszej fazy starzenia związany był ze spadkiem średniej temperatury poniżej 15°C, natomiast końcowa faza tego procesu wywoływana była przez trwały spadek temperatury poniżej 10°C. Udowodniono istotną zależność między datą indukcji i przebiegiem procesu starzenia liści (zawartością chlorofilu i białek) i temperaturą, przy czym zależność ta była istotnie większa dla formy wczesnej niż dla formy późnej (Kraj 2014, 2015). Wcześniej starzejące się osobniki wykazywały większą wrażliwość na zmiany temperatury w porównaniu do osobników później starzejących się.

Po raz pierwszy stwierdzono, że degradacja chlorofilu w czasie starzenia liści buka związana jest ze wzrostem aktywności chlorofilazy (Kraj 2015). Dowodami na to są wzrost zawartości chlorofilidów - produktów reakcji katalizowanej przez enzym (test *in vivo* aktywności enzymu) i wzrost aktywności enzymów w analizie *in vitro*. Aktywność enzymu była silnie związana ze zmianami temperatury i terminami jej spadków. Równoległa analiza aktywności Mg-dechelatazy wykazała śladowe wartości. Nagłe spadki temperatury powodowały zróżnicowany u form fenologicznych i zależny od ich wrażliwości na zmiany temperatury wzrost aktywności chlorofilazy i powstawania chlorofilidów. Wyniki dowodzą, że w związku z niewielką aktywnością Mg-dechelatazy wzrost zawartości feofityny, produktu dechelatacji chlorofilu związany jest z obecnością związków chelatujących. Mała aktywność Mg-dechelatazy potwierdziła również główną rolę chlorofilazy w procesie degradacji chlorofilu (Kraj 2015).

Uwarunkowany zmianami temperatury i fenologicznymi cechami osobników buka zróżnicowany termin indukcji jesiennego starzenia liści związany był ze wzrostem zawartości reaktywnych form tlenu (RFT). Spowodowane było to charakterystyczną dla form fenologicznych zwiększoną szybkością powstawania tych cząstek przy jednoczesnym spadku zdolności systemu antyoksydacyjnego liści do ich usuwania (Kraj 2016). Profil zmian stanu redoks komórek starzejących się liści spowodowany powstawaniem anionu ponadtlenkowego,

nadtlenku wodoru i dialdehydu malonowego (MDA) (miary peroksydacji lipidów) był zależny od zmian temperatury, etapu starzenia i fenologicznych cech osobników. Stwierdzono istotną korelację między szybkością starzenia (zawartością markerów starzenia) i powstawaniem RFT. Największą szybkość powstawania RFT i najwyższą zależność między ich zawartością i stopniem zaawansowania procesu starzenia stwierdzono u najbardziej wrażliwej na zmiany temperatury formy wczesnej buka. Było to związane z szybszym przebiegiem degradacji chlorofilu i uwalnianiem wolnych cząsteczek tego barwnika biorących udział w powstawaniu RFT. Charakterystyczny dla form fenologicznych wzrost produkcji RFT w czasie starzenia powodujący stres oksydacyjny i skorelowany z nierównymi zmianami zawartości chlorofilu oznacza, że był to czynnik biorący udział w różnicowaniu daty indukcji i kontroli jesiennego starzenia liści osobników buka (Kraj 2016).

Formy fenologiczne buka wykazywały istotne różnice zarówno w zakresie zawartości kwasu askorbinowego i glutationu jak i zdolności komórek do ich utrzymywania w stanie zredukowanym (Kraj 2016). Osobniki później starzejące się zawierały więcej kwasu askorbinowego i glutationu zarówno w okresie poprzedzającym jak i przez cały okres starzenia. Reakcją osobników buka wynikającą ze związanego z indukcją starzenia wzrostu zawartości RFT była przyspieszona, najszybsza u formy późnej synteza kwasu askorbinowego i glutationu. Powodowało to większą zdolność antyoksydacyjną liści formy późnej w porównaniu do formy wczesnej. Spadek temperatury i większa szybkość starzenia liści oraz mniejsza zawartość antyoksydantów w liściach formy wczesnej były przyczyną większego wzrostu udziału utlenionych form kwasu askorbinowego i glutationu w liściach tej formy w porównaniu do liści później starzejących się osobników. Stwierdzono, że temperatura nie wpływała bezpośrednio na zawartość kwasu askorbinowego i glutationu w liściach buka. Miała ona natomiast istotne znaczenie dla daty początku wzrostu procentowego udziału utlenionej formy antyoksydantów, i tym samym zdolności systemu antyoksydacyjnego do przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu.

Formy fenologiczne różniły się aktywnością enzymów antyoksydacyjnych i profilami jej zmian (Kraj 2017a). Czynnikiem decydującym o zmianach aktywności enzymatycznej części systemu antyoksydacyjnego były zmiany temperatury i uwarunkowana fenologicznymi cechami wrażliwość osobników na jej spadek. Najbardziej istotną cechą buka była większa aktywność enzymów antyoksydacyjnych przez cały okres starzenia, a nawet przed indukcją tego procesu (z wyjątkiem katalazy) u późnej formy fenologicznej. Forma ta była mniej wrażliwa na zmiany temperatury, a aktywność enzymów, nawet przy dużych wahaniami



temperatury, spadała w mniejszym stopniu w porównaniu do wczesnej formy fenologicznej. Wyjątkiem była dysmutaza ponadtlenkowa, która stanowi pierwszą i bardzo istotną linię obrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Na podstawie analizy korelacji wydaje się, że enzym jest w większym stopniu ewolucyjnie przystosowany do tolerowania niekorzystnych warunków, w tym termicznych. Istotny wpływ temperatury na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i zróżnicowana reakcja form fenologicznych na jej zmiany prowadziła do nierównego spadku aktywności enzymów między formami w miarę postępu starzenia co zostało wykazane zarówno w kolejnych latach badań jak i w ciągu danego okresu wegetacji (Kraj 2017a).

Profil zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych zależał od rodzaju enzymu i cech fenologicznych osobników buka. Podczas gdy katalaza i reduktaza monodehydroaskorbinianowa wykazywały ciągły spadek aktywności począwszy od pierwszego etapu starzenia, to spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej mający miejsce w pierwszym etapie starzenia był odwracalny po wzroście i stabilizacji temperatury w stopniu proporcjonalnym do fenologicznych cech osobników. W związku z tym liście buka utrzymywały większość aktywności tych enzymów do początku końcowego etapu starzenia, szczególnie u późnej formy fenologicznej. Forma ta charakteryzowała się największym stopniem „odbudowy” aktywności enzymów po jej spadku na początku września co zapewniało lepszą kontrolę nad stresem oksydacyjnym i opóźnienie procesu starzenia.

Nierówna odporność form fenologicznych na akumulację jonu ponadtlenkowego wynikała ze zróżnicowanej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Przewaga formy późnej nad formą wczesną w zakresie przeciwdziałania akumulacji jonu ponadtlenkowego oparta była na większej aktywności enzymu, mniejszym spadku jego aktywności w pierwszym etapie starzenia i większym „odbudowywaniu” tej aktywności po ponownym wzroście temperatury w drugiej połowie września (Kraj 2017a). Kontrola nad zmianami zawartości nadtlenu wodoru w starzejących się liściach fenologicznych form buka realizowana była przez różną aktywność katalazy i enzymów cyklu Foyer-Halliwell-Asada. Aktywność katalazy u formy późnej charakteryzowała się większą odpornością na obniżenie temperatury i nie wykazywała spadku w pierwszym etapie starzenia liści. Spośród wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych aktywność katalazy była najbardziej związana ze zmianami temperatury i cechami fenologicznymi osobników. Większa odporność liści późnej formy fenologicznej na wzrastającą zawartość nadtlenu wodoru wynikała również z większej

aktywności enzymów cyklu Foyer-Halliwell-Asada. Dla wysokiej aktywności tego cyklu konieczna jest nie tylko odpowiednio wysoka aktywność peroksydazy askorbinianowej, ale też zapewnienie dostępu peroksydazy askorbinianowej do zredukowanej formy kwasu askorbinowego. Proces ten jest realizowany przy udziale pozostałych enzymów cyklu przez regenerację zredukowanej formy kwasu askorbinowego przy wykorzystaniu NADPH. Ze względu na stwierdzoną w badaniach bardzo małą aktywność DHAR, reakcja regeneracji kwasu askorbinowego zachodzi dzięki aktywności MDHAR. Wymaga ona dostępu do NADPH powstającego w procesie fotosyntezy. Dzięki późniejszej i wolniejszej degradacji chlorofilu późna forma fenologiczna produkuje więcej NADPH co skutkuje szybszą i wystarczającą dla zapewnienia odpowiedniej aktywności cyklu Foyer-Halliwell-Asada regeneracją kwasu askorbinowego. Różnice w szybkości degradacji chlorofilu między formami fenologicznymi powodowały nie tylko różną akumulację nadtlenu wodoru i jonów ponadtlennokowych, ale również różnice w wydajności systemu antyoksydacyjnego liści. Zróżnicowany u form fenologicznych wpływ temperatury na aktywność systemu antyoksydacyjnego powodował wzrost zawartości nadtlenu wodoru i jonu ponadtlennokowego z różną szybkością decydując o natężeniu stresu oksydacyjnego i szybkości zachodzenia procesu starzenia.

Badania pozwoliły na przedstawienie hipotetycznego modelu potwierdzającego biochemiczne uwarunkowania różnic terminu indukcji i szybkości przebiegu procesu starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi (Kraj 2017a). Wykazano, że czynnikiem wywołującym i modyfikującym przebieg jesiennego starzenia liści fenologicznych form buka jest spadek temperatury występujący przy około 13 godzinnym fotoperiodzie. Odmienne reakcje osobników buka o różnych cechach fenologicznych wywołane różną ich wrażliwością na spadek temperatury były przyczyną charakterystycznych dla nich różnic terminów początku starzenia, czasu trwania jego etapów i długości życia liści. Szybkość zachodzenia procesu starzenia charakterystyczna dla form fenologicznych była proporcjonalna do szybkości uwalniania wolnych cząsteczek chlorofilu i fotoaktywnych produktów jego degradacji. Absorpcja światła przez wolne cząsteczki chlorofilu i produkty jego rozkładu powodowała powstawanie reaktywnych form tlenu co w połączeniu z ich pulą z peroksydomów i mitochondriów, i spadającą w różnym stopniu u form fenologicznych zdolnością systemu antyoksydacyjnego do usuwania RFT prowadziło do akumulacji między innymi anionu ponadtlennokowego i nadtlenu wodoru. Większa aktywność dysmutazy ponadtlennokowej oraz katalazy i enzymów cyklu Foyer-Halliwell-Asada u później starzejących

się osobników chroniła je w większym stopniu przed skutkami stresu oksydacyjnego. Osobniki te charakteryzowały się również większą zawartością drobnocząsteczkowych antyoksydantów (kwasu askorbinowego i glutationu) i większą aktywnością MDHAR co wpływało dodatnio na dostęp do zredukowanej formy kwasu askorbinowego dla peroksydazy askorbinianowej, szybszy rozkład  $H_2O_2$ , lepszą ochronę liści przed stresem oksydacyjnym i opóźnienie procesu starzenia (Kraj 2017a).

Głównym zadaniem starzenia liści jest remobilizacja i recykling makrocząstek komórkowych. Udział remobilizowanego azotu w powstawaniu nowych liści na wiosnę następnego roku u buka wynosi około 15% (Dyckmans, Flessa 2001). W związku z tym wydajność procesu remobilizacji i dostępność gromadzonego azotu u tego gatunku jest tym bardziej istotna. Określono wpływ charakterystycznej dla form fenologicznych długości okresu starzenia liści i zmian temperatury na wydajność remobilizacji azotu (Kraj 2014). Zarówno wizualna ocena starzenia liści jak i analiza zmian zawartości chlorofilu wykazały krótszy okres starzenia liści późnej formy fenologicznej w porównaniu do formy wczesnej. Długość okresu starzenia od daty pierwszych wizualnych objawów zmiany barwy liści do ich opadania wynosiła około 15, 13 i 10 dni dla wczesnej, pośredniej i późnej formy fenologicznej. Podobnie długość okresu degradacji chlorofilu od terminu indukcji starzenia do całkowitego przebarwienia liści wynosiła: około 47, 40 i 32 dni (Kraj 2014). Stwierdzono, że w związku z zachodzeniem procesu remobilizacji głównie w początkowych fazach starzenia oraz wcześniej indukowanym i dłuższym procesem starzenia u wczesnej formy fenologicznej znaczna część remobilizacji u tej formy zachodziła w wyższej temperaturze. Przyczynia się to do większego procentowego udziału remobilizowanych związków azotowych i większej wydajności procesu remobilizacji u formy wczesnej w stosunku do formy późnej. Krótszy okres starzenia zachodzący w mniej korzystnych warunkach termicznych prowadził do mniejszej wydajności remobilizacji azotu u formy późnej. Większą wydajność remobilizacji azotu u wczesnej w porównaniu z późną formą fenologiczną potwierdził istotnie większy wzrost i końcowa wartość stosunku C/N przed opadaniem liści.

Wykazano wzrost aktywności enzymów proteolitycznych charakterystyczny dla fenologicznych cech osobników buka i etapów starzenia. Aktywność tych enzymów była istotnie skorelowana ze zmianami zawartości markerów starzenia (chlorofilu i białek) i wynikała z funkcji pełnionych przez te enzymy w procesie degradacji białek i ich właściwości katalitycznych.

Mimo, że starzenie liści jest przede wszystkim oksydacyjnym procesem degradacji prowadzącym do ich zamierania, a następnie opadania, głównym zadaniem mechanizmów kontrolujących termin indukcji oraz szybkość przebiegu i długość trwania tego procesu jest zapewnienie maksymalnej wydajności remobilizacji i recyklingu składników odżywczych oraz pozytywnego wpływu tych procesów na dalszy wzrost i rozwój drzew. Szczególnie ważnym przystosowaniem gatunku jest ochrona liści przed zbyt wczesnym wejściem w końcową fazę starzenia powodującą ich zamierania. Zadanie to spełniają u fenologicznych form buka różna wrażliwość na spadającą temperaturę i fotoperiod, które indukują proces starzenia liści i przez charakterystyczną dla form fenologicznych kontrolę aktywności systemu antyoksydacyjnego komórek decydują o ich odporności na stres oksydacyjny (Kraj 2014, 2016, 2017a). Przedstawione różnice między fenologicznymi formami buka w zakresie kontroli nad terminem indukcji i szybkością procesu starzenia mają wpływ na jego długość i przez to na wydajność remobilizacji. Dzięki wcześniejszej indukcji starzenia i wydłużonemu okresowi tego procesu większość białek liści u formy wczesnej było remobilizowanych przed początkiem, najbardziej degradującego dla makrocząsteczek komórkowych, końcowego etapu tego procesu. Liście późnej formy fenologicznej wykazywały mniejszy poziom remobilizacji związków azotowych ze względu na krótszy proces starzenia zachodzący w mniej korzystnych warunkach termicznych. Wpływ krótszego okresu starzenia u tej formy był częściowo rekompensowany opóźnionym terminem indukcji starzenia liści i większą tolerancją na stres oksydacyjny we wstępnych etapach starzenia.

Obrączkowanie pędów osobników buka powodowało przerwanie ciągłości floemu oraz akumulację węglowodanów w liściach (Kraj 2017b). Zmiany metaboliczne były z jednej strony wynikiem tej akumulacji, a z drugiej miały związek z biochemicznymi i fizjologicznymi cechami osobników buka. Liście form fenologicznych różniły się zdolnością do akumulacji węglowodanów i szybkością reakcji na wzrost ich zawartości. Prowadziło to do charakterystycznych dla form fenologicznych zmian metabolicznych skutkujących zaburzeniem równowagi węglowo-azotowej, wzrostem C/N i degradacją chlorofilu. Charakterystyczna dla form fenologicznych akumulacja cukrów wpływała na szybkość degradacji chlorofilu i karotenoidów, wywoływała stres oksydacyjny oraz modyfikowała aktywność antyoksydacyjną i szybkość przebiegu starzenia liści.

Zmiany zawartości cukrów decydujące o szybkość wzrostu C/N i degradacji chlorofilu powodowały intensywniejsze powstawanie RFT i szybszy przebieg procesu starzenia u formy

wczesnej w porównaniu do formy późnej. Forma późna charakteryzowała się większym wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych i mniejszym spadkiem zawartości karotenoidów. Skutkowało to większym wzrostem odporności tej formy fenologicznej na stres oksydacyjny w porównaniu do formy wczesnej i opóźnieniem procesu starzenia.

Wykazano istotny wpływ biochemicznych i fizjologicznych cech form fenologicznych na starzenie liści indukowane przerwaniem ciągłości floemu i zahamowaniem eksportu asymilatów. Cechy form fenologicznych wpływały zarówno na poziom jak i profil zmian barwników liści, modyfikowały poziom stresu oksydacyjnego wywołanego akumulacją węglowodanów jak i zmieniały aktywność systemu antyoksydacyjnego co potwierdza fizjologiczno-biochemiczne różnice między formami fenologicznymi buka zwyczajnego.

Najważniejsze nowatorskie osiągnięcia przedstawione w osiągnięciu naukowym, stanowiące istotny wkład w rozwój nauki:

1. Decydującym czynnikiem indukującym i regulującym proces jesiennego starzenia liści buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) jest spadek temperatury występujący przy fotoperiodzie około 13 godzin.
2. Jesienne starzenie liści buka zachodzi w dwóch lub trzech fazach w zależności od fenologicznych cech osobników. Zróżnicowana wrażliwość form fenologicznych na zmiany temperatury powodowała różnice w terminie indukcji starzenia, jego szybkości i długości życia liści.
3. Wykazano krótszy okres starzenia liści późnej formy fenologicznej w porównaniu do formy wczesnej.
4. Degradacja chlorofilu w czasie starzenia liści buka związana jest ze wzrostem aktywności chlorofilazy. Aktywność enzymu była silnie związana ze zmianami temperatury i terminami jej spadków. Mg-dechelataza wykazywała bardzo małą aktywność.
5. Przedstawiono dowody na biochemiczne uwarunkowania różnic terminu indukcji i szybkości przebiegu procesu starzenia liści u osobników buka różniących się cechami fenologicznymi. Stwierdzono, że forma późna charakteryzuje się wolniejszym rozkładem chlorofilu, mniejszą produkcją reaktywnych form tlenu i większą zdolnością do ochrony przed stresem oksydacyjnym.
6. Przedstawiono model obrazujący przyczyny późniejszej indukcji i wolniejszego przebiegu starzenia liści u późnej formy fenologicznej.

7. Wykazano większą wydajność remobilizacji azotu i jego związków u formy wczesnej w porównaniu do formy późnej. Udowodniono wpływ fenologicznych cech osobników, ich wrażliwości na zmiany temperatury i długości okresu starzenia na proces remobilizacji azotu.
8. Akumulacja węglowodanów w liściach buka wywoływała charakterystyczne dla form fenologicznych zaburzenie równowagi węglowo-azotowej i wzrost C/N. Wpływało to na różnice szybkości degradacji chlorofilu, wielkości stresu oksydacyjnego i modyfikowało przebieg starzenia liści fenologicznych form buka.

### Literatura

- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3–22.
- Delpierre N., Dufrene E., Soudani K., Ulrich E., Cecchini S., Boe J., Francois C. 2009. Modelling interannual and spatial variability of leaf senescence for three deciduous tree species in France. *Agricultural and Forest Meteorology* 149: 938–948.
- Dolnicki A., Kraj W. 2001. Leaf morphology and the dynamics of frost-hardiness of shoots in two phenological forms of European beech (*Fagus sylvatica* L.) from Southern Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 4
- Dyckmans J., Flessa H. 2001. Influence of tree internal N status on uptake and translocation of C and N in beech: a dual C-13 and N-15 labeling approach. *Tree Physiology* 21: 395–401.
- Fracheboud Y., Luquez V., Bjorken L., Sjodin A., Tuominen H., Jansson S. 2009. The control of autumn senescence in European aspen. *Plant Physiology* 149: 1982–1991.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., Masclaux-Daubresse C. 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies* 333: 382–391.
- Himelblau E., Amasino R.M. 2001. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158: 1317–1323.
- Kraj W.** 2014. Proteolytic activity and nitrogen remobilisation in senescing leaves of phenological forms of *Fagus sylvatica*. *Dendrobiology* 72: 163-176.
- Kraj W.** 2015. Chlorophyll degradation and the activity of chlorophyllase and Mg-dechelataze during leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. *Dendrobiology* 74: 43-57.

- Kraj W.** 2016. Reactive oxygen species and antioxidant levels as the factors of autumn senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 32.
- Kraj W.** 2017a. Antioxidative enzyme activity as the factor causing differential autumn senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 16.
- Kraj W.** 2017b. Stem girdling affects the carbon/nitrogen imbalance and oxidative stress, and induces leaf senescence in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 59(1), DOI: 10.1515/abcsb-2016-0022.
- Kraj W.** 2010. Biochemical events during leaf senescence of phenological forms of European beech. Book of Abstracts. XVII FESPB Congress, Federation of European Societies of Plant Biology, Walencja – Spain, 04-09 July 2010.
- Kraj W.** 2013. Proteolytic activity of senescing leaves in phenological forms of beech (*Fagus sylvatica* L.) and its role in nitrogen remobilization. 6th European Workshop on Leaf Senescence. 14-18th of October 2013, Versailles, France.
- Keskitalo J, Bergquist G, Gardestro'm P, Jansson S 2005. A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology* 139: 1635–1648.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115–136.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Menzel A. 2003. Plant phenological anomalies in Germany and their relation to air temperature and NAO. *Climatic Change* 57: 243–263.
- Rennenberg H., Kreutzer K., Papen H., Weber P. 1998. Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. *New Phytologist* 139: 71–86.
- Schuster C., Kirchner M., Jakobi G., Menzel A. 2014. Frequency of inversions affects senescence phenology of *Acer pseudoplatanus* and *Fagus sylvatica*. *International Journal of Biometeorology* 58: 485–498.
- Vitasse Y., Delzon S., Bresson C.C., Michalet R., Kremer A. 2009. Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research* 39: 1259–1269.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych)

Moja działalność naukowa skupia się na dwóch głównych tematach. Rozwiązywane przeze mnie problemy naukowe wymagają podejścia interdyscyplinarnego i zastosowania metod z zakresu fizjologii, biochemii i biologii molekularnej. Głównymi kierunkami badań naukowych, którymi się zajmowałem była:

1. fizjologia i biochemia drzew leśnych, głównie buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)
2. bioróżnorodność drzew leśnych i grzybów

Dzięki licznym stażom i szkoleniom, które umożliwiły mi opanowanie i nabranie doświadczenia w zakresie metod biologii molekularnej i biochemii mogłem realizować swoje zainteresowania naukowe i projekty badawcze.

Ze względu na wystąpienie w ostatnich latach zamierania jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) poważna część mojej pracy badawczej poświęcona była bioróżnorodności grzybów wywołujących chorobę oraz biochemicznym i molekularnym podstawom odporności jesionu na zamieranie. Przeważającą część moich badań dotyczących bioróżnorodności grzybów realizowałem we współpracy z Panem Prof. dr hab. Tadeuszem Kowalskim. Pragnę w tym miejscu bardzo podziękować Panu Profesorowi za współpracę, wspólne projekty badawcze i pomoc w realizacji moich zainteresowań naukowych.

### Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Na początku mojej działalności naukowej przez krótki czas zajmowałem się kulturami tkankowymi drzew. Była to kontynuacja moich zainteresowań naukowych wynikających z tematu pracy magisterskiej i realizowanych w nowo powstałym zespole dydaktycznym Fizjologii Roślin Drzewiastych na Wydziale Leśnym Akademii Rolniczej w Krakowie. Badania dotyczyły optymalizacji metod uzyskiwania sterylnych kultur i rozmnażania wybranych gatunków drzew m. in. buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) (Dolnicki, Kraj 1998; Kraj, Dolnicki 2003), świerka pospolitego (*Picea abies* L. (Karst)) (Kraj, Guri 1998; Kraj 2000) i robinii białej (*Robinia pseudoacacia* L.) (Kraj, Dolnicki 1995; Kraj i in. 1995b). W ramach tych prac współpracowałem z firmą Plant Cell Technology (Plant Cell Technology, USA, Waszyngton, DC), producentem PPM (Plant Preservative Mixture) - odczynnika wspomagającego odkażanie i zabezpieczającego sterylność kultur tkankowych roślin, która zwróciła się do mnie o zbadanie możliwości stosowania PPM w kulturach tkankowych i jego wpływu na indukcję i namnażanie wybranych gatunków drzew. PPM zwiększał o 30%



sterylność kultur uzyskanych z fragmentów zarodków buka i o 70-80% sterylność kultur uzyskanych z pąków przy braku ujemnego wpływu na żywotność eksplantatów i ich zdolności regeneracyjnych (Kraj, Dolnicki 2003). Wykazano również korzystny wpływ PPM na sterylność i regenerację ozdobnych roślin iglastych (Kraj, Guri 1998).

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W., Dolnicki A. 1995.** Odkazanie nasion buka (*Fagus sylvatica* L.) i robinii pseudoacacji (*Robinia pseudoacacia* L.) do hodowli *in vitro*". Materiały na sesję naukową "Gospodarka Leśna w Karpatach", Kraków.

**Kraj W., Pilczuk B., Dolnicki A. 1995a.** Opracowanie metod odkazania eksplantatów buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.). w: Materiały 1. Ogólnopolskiej Konferencji "Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin", 15-17 grudnia 1994, Zakład Fizjologii Roślin PAN, 223-227.

**Kraj W., Pilczuk B., Dolnicki A. 1995b.** Opracowanie metod odkazania nasion *Robinia pseudoacacia*. w: Materiały 1. Ogólnopolskiej Konferencji "Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin", 15-17 grudnia 1994, Zakład Fizjologii Roślin PAN, 229-236.

Dolnicki A., **Kraj W.** 1998. Odkazanie eksplantatów buka (*Fagus sylvatica* L.) do kultur tkankowych. *Acta Agr. et Silv., Ser. Silv.* 36: 49-62.

**Kraj W., Guri A. 1998.** Decontamination of immature zygotic embryos and apical buds of different conifer species. XXXVII Congresso Viterbo, 28-30 Settembre 1998, Florence.

**Kraj W., Dolnicki A., Nawrot-Chorabik K. 1999.** Sterilization of the explants from beech for the *in vitro* cultures, *Recent Advances in Plant Biotechnology*, 1999, Stara Lesna, Slovak Republic: 97.

**Kraj W. 2000.** Induction and growth of callus on cotyledons of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) *in vitro* cultures. *Acta Agraria et Silvestria., Series Silvestris* 38: 33-45.

**Kraj W., Dolnicki A. 2003.** The influence of PPM upon the sterility of the *in vitro* cultures in European beech (*Fagus sylvatica* L.), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72: 303-307.

Równolegle realizowałem projekty naukowe dotyczące fizjologii buka zwyczajnego ze szczególnym uwzględnieniem fizjologicznych cech fenologicznych form tego gatunku. Badania wpływu moczenia nasion w roztworach regulatorów wzrostu wykazały ujemny wpływ TIBA (kwas 2,3,5-trójjodobenzoesowy), MH (hydrazyd kwasu maleinowego) i dużego stężenia ABA (kwas abscysynowy) (200 ppm) na kiełkowanie nasion buka.

Stwierdzono stymulujące działanie kinetyny i małego stężenia ABA (100 ppm) na wzrost siewek (Kraj i in. 1995a; Kraj i in. 1995b; Dolnicki, Kraj 1995). Stwierdzono tendencję do zwiększenia odporności na niską temperaturę przez inhibitory wzrostu (TIBA i MH) i obniżania tej odporności przez GA<sub>3</sub>, CCC (chlorek chlorocholiny) i ABA.

Wyniki tych badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W., Dolnicki A., Pilczuk B. 1995a.** Wzrost i mrozoodporność jednorocznych siewek buka (*Fagus sylvatica* L.) wyrosłych z nasion moczonych w roztworach regulatorów wzrostu. Sylwan, 139(10): 103-113.

**Kraj W., Dolnicki A., Pilczuk B. 1995b.** Wzrost i mrozoodporność dwuletnich siewek buka (*Fagus sylvatica* L.) wyrosłych z nasion moczonych w roztworach regulatorów wzrostu. Sylwan, 139(12): 91-96.

Dolnicki A., **Kraj W. 1995.** Próba zwiększenia mrozoodporności sadzonek buka (*Fagus sylvatica* L.) poprzez egzogenne stosowanie regulatorów wzrostu. W: Mirek Z., Wójcicki J. (red.) Szata roślinna Polski w procesie przemian, Materiały konferencji i sympozjów 50 Zjazdu Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Kraków 26.06-01.07.1995.

We współpracy z Panem Profesorem Adamem Dolnickim prowadziłem badania dotyczące mrozoodporności drzew. Przeprowadzone zostały badania nad przydatnością metody Dextera do oznaczania mrozoodporności drzew (Dolnicki, Kraj 1996). Stwierdzono, że indeks uszkodzeń mrozowych obliczany zgodnie z równaniem Flinta (Flint i in. 1967) lepiej charakteryzował stopień odporności na niską temperaturę niż względne elektroprzewodnictwo dyfuzatów. Badania wykazały, że ze względu na duży udział tzw. tła (elektrolity wymywane z nieprzemrażanych tkanek) u drzew (kilka do kilkanaście % u iglastych i 20-30% u liściastych) stopień uszkodzenia tkanek pod wpływem przemrażania należy wyrażać w stosunku do elektrolitów, które nie mogą dyfundować z nieuszkodzonych tkanek, a nie w stosunku do ogólnej sumy elektrolitów dyfundujących z zabitych komórek.

W zakresie mrozoodporności drzew i w związku z prowadzonymi badaniami nad możliwością wprowadzenia jodły olbrzymiej (*Abies grandis* Lindl.) do uprawy w Polsce prowadziłem również badania nad mrozoodpornością proveniencji tego gatunku na powierzchni IUFRO w Beskidzie Sądeckim. Badania wykazały, że na początku jesieni proveniencje jodły olbrzymiej, zwłaszcza pochodzące z rejonów oceanicznych, istotnie ustępowały odpornością na mróz jodle pospolitej. W późniejszym terminie różnice między

gatunkami jodły malały a na wiosnę zanikały (Dolnicki, Kraj 1995a; Dolnicki, Kraj 1998). Stwierdzono, że jodła pospolita wykazywała wcześniejszy początek pęknięcia pąków na wiosnę niż jodła olbrzymia, co czyniło ją bardziej wrażliwą na późne przymrozki. Wykazano, że proveniencje *A. grandis* wykazywały wystarczający poziom mrozoodporności do uprawy w Beskidzie Sądeckim (Dolnicki, Kraj 1995a; Dolnicki, Kraj 1998).

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

Dolnicki A., **Kraj W. 1995a**. Zastosowanie metody Dextera do oznaczania mrozoodporności proveniencji jodły olbrzymiej (*Abies grandis* Mill.), IX Ogólnokrajowe Seminarium Grupy Roboczej "Mrozoodporność", 23.05-24.05.1995 Kórnik, PAN, Poznań, 64-66.

Dolnicki A., **Kraj W. 1996**. Przydatność metody Dextera do oznaczania mrozoodporności drzew leśnych. W: Grzesiak S., Miszalski Z. (red.) Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. Materiały Ogólnopolskiej Konferencji 23-25 XI 1996, Zakład Fizjologii Roślin PAN Kraków, 137-144.

Dolnicki A., **Kraj W. 1998**. Dynamics of frost resistance in various provenances of *Abies grandis* Lindl. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 1: 51-58.

W rozprawie doktorskiej poświęconej zmienności genetycznej świerka pospolitego określiłem polimorfizm genomowego DNA za pomocą markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem materiału zebranego z powierzchni doświadczalnej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku (IUFRO 1972 NS Provenance Experiment). Analizowano genomy DNA pochodzący z 20 proveniencji świerka pospolitego (15 osobników/populację, razem 300 osobników). Moja praca doktorska oparta na badaniu zmienności proveniencji świerka pospolitego przy użyciu markerów molekularnych DNA była jednym z pierwszych takich projektów naukowych w leśnictwie realizowanych w Polsce.

W badaniach uzyskano markery RAPD pozwalające na identyfikację osobników większości proveniencji. Markery RAPD wykorzystano jako skuteczne narzędzie do oceny zmienności genetycznej. Stwierdzono istotne zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne między badanymi populacjami. Zróżnicowanie polskich proveniencji świerka nie było spowodowane ich przestrzennym oddaleniem lub różnicami wysokości nad poziom morza i warunkami klimatycznymi miejsc ich pochodzenia. Zależności takie występowały jednak lokalnie na ograniczonym przestrzennie obszarze. Na podstawie analizy UPGMA stwierdzono, że badane

populacje tworzą dwie grupy: jedną obejmującą populacje z północno-wschodniej Polski (obszar nordycko-bałtyckiego zasięgu świerka pospolitego) i drugą z Polski południowej wchodzącą w skład północnych rejonów zasięgu hercyńsko-sudecko-karpackiego.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej były tematem następujących prac i wygłoszonych wykładów:

**Kraj W.** 2002. The estimation of genetic variation within and between Polish provenances of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) on the basis of RAPD polymorphism, *Electronic Journal of Polish Agricultural University, series Forestry*, 5(2).

Wykład na seminarium w Instytucie Dendrologii PAN pt. "Markery molekularne w badaniach genetycznych i selekcji drzew leśnych"

Wykład dla studentów i pracowników Wydziału Leśnego w Krakowie pt. "Zastosowanie biologii molekularnej w leśnictwie"

Po obronie doktoratu kontynuowałem badania dotyczące fizjologii buka zwyczajnego. Określono różnice morfologiczne liści i mrozoodporność późnej i wczesnej formy fenologicznej buka. Stwierdzono wpływ warunków środowiska na rozmiary liści. Wczesna forma buka charakteryzowała się dłuższymi, szerszymi i większymi liśćmi oraz wcześniejszym i w większej liczbie tworzeniem pędów świętojańskich (Dolnicki, Kraj 1999a; Dolnicki, Kraj 1999b). Wymiary liści malały wraz ze wzrastającą wysokością nad poziom morza (Dolnicki, Kraj 2001). Formy fenologiczne nie wykazywały różnic pod względem odporności na jesienne przymrozki. Badania wykazały natomiast, że forma wczesna buka była nie tylko bardziej narażona na spóźnione przymrozki wiosenne, ale charakteryzowała się również wcześniejszym i szybszym rozhartowaniem ubiegłorocznych pędów skutkującym większą wrażliwością na uszkodzenia mrozowe przed pękaniem pąków (Dolnicki, Kraj 1999b; Dolnicki, Kraj 2001). Stwierdzono również większą odporność na niskie temperatury osobników pochodzących z terenów górskich w porównaniu z osobnikami z łagodnego klimatu (Dolnicki, Kraj 1999a).

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

Dolnicki A., **Kraj W.** 1999a. Certain morphological and physiological traits of the early and of the late forms of beech-tree. w: *Third International Conference „Ecophysiological aspects*

of plant responses to stress factors”, Cracow, September 14-16, 1999, Acta Physiol. Plant. 21(3): 19.

Dolnicki A., **Kraj W.** 1999b. Dynamika mrozoodporności wczesnych i późnych form buka. XI Ogólnopolskie Seminarium Grupy Roboczej "Mrozoodporność", Kórnik, 18-19 maja 1999, PAN Poznań, 136-139.

Dolnicki A., **Kraj W.** 2001. Leaf morphology and the dynamics of frost-hardiness of shoots in two phenological forms of European beech (*Fagus sylvatica* L.) from southern Poland, EJPAU, Vol. 4, nr 2, series Forestry.

W zakresie głównego tematu moich zainteresowań naukowych dotyczącego fenologicznych form buka zwyczajnego zrealizowałem również projekt naukowy, którego celem była ocena zmienności i struktury genetycznej fenologicznych form buka zwyczajnego (Kraj, Sztorc 2009). Stwierdzono, że populacje buka wykazują istotne różnice między formami fenologicznymi pod względem zróżnicowania genetycznego, które spada wraz z opóźnieniem wiosennych i jesiennych faz fenologicznych u osobników tego gatunku. Formy fenologiczne charakteryzowały się wzrostem udziału zmienności wewnątrzpopulacyjnej z 64% (u wczesnej) do 90% (u późnej). Różnice genetyczne występujące między formami fenologicznymi buka sugeruje, że ich istnienie jest ewolucyjnie ukształtowaną strategią pozwalającą na wzrost i rozwój tego gatunku w zróżnicowanym klimatycznie środowisku. Stwierdzone zależności między strukturą genetyczną i fenologicznymi cechami osobników wskazują, że klimatyczne czynniki selekcyjne kształtują genetyczne zróżnicowanie między formami fenologicznymi. Później rozwijające się na wiosnę osobniki charakteryzują się wyższym poziomem wewnątrzpopulacyjnej zmienności co zapewnia im większe szanse przeżycia w niekorzystnych warunkach termicznych. Różnice zmienności genetycznej między formami fenologicznymi wynikają z ewolucyjnie uwarunkowanej adaptacji ukształtowanej w ciągu historii gatunku i nacisku selekcyjnego wywieranego na osobniki buka o różnych cechach fenologicznych w zmiennych warunkach środowiska. Obie przyczyny genetycznego zróżnicowania form fenologicznych buka wpływają na fenotypową selekcję gatunku przystosowującą go do wzrostu w zróżnicowanych warunkach klimatycznych.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy:

**Kraj W.**, Sztorc A 2009. Genetic structure and variability of phenological forms in the European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Annals of Forest Science* 66: 203.

### **Badania naukowe dotyczące bioróżnorodności grzybów**

Pierwszą pracą z tego zakresu była molekularna identyfikacja grzyba *Chalara ovoidea* po raz pierwszy stwierdzonego przez Tadeusza Kowalskiego (dane niepublikowane) w południowej Polsce na drzewach buka wykazujących objawy zamierania. Za pomocą metod molekularnych potwierdzono identyfikację gatunku grzyba opartą na cechach morfologicznych (Kraj, Kowalski 2005).

Wyniki analiz przedstawiono w następującej pracy:

**Kraj W.**, Kowalski T. 2005. Identification of Polish strains of *Chalara ovoidea* using RAPD molecular markers. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 74: 35-42.

### ***Badanie zróżnicowania genetycznego grzybów powodujących zamieranie pędów sosny***

W ramach kierowanego przeze mnie grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych pt: „Badanie zróżnicowania genetycznego grzybów powodujących zamieranie pędów sosny przy pomocy markerów molekularnych” przeprowadziłem badania nad zmiennością genetyczną trzech patogenów sosny: *Gremmeniella abietina*, *Sclerophoma pythiophila* i *Cenangium ferruginosum*. Spośród chorób, którym ulegają w Polsce drzewa leśne, szczególnego znaczenia nabierają choroby sosny z uwagi na jej duży udział w powierzchni lasów Polski. Do jednej z najważniejszych grup tych chorób należą zgorzele pędów, którym ulegają zarówno siewki w szkółkach jak i sosny w drzewostanach wszystkich klas wieku. Spośród wielu grzybów infekujących pędy sosny w Polsce, pod względem częstości występowania i znaczenia gospodarczego najważniejsze są trzy gatunki grzybów: *Gremmeniella abietina*, *Sclerophoma pythiophila* i *Cenangium ferruginosum*. Ten stan wpłynął na sformułowanie zasadniczego celu projektu badawczego. Ze względu na brak odpowiednich sekwencji DNA badanych grzybów w okresie jego realizacji do badania zmienności genetycznej zastosowano markery molekularne: RAMS (Random Amplified Microsatellites) i PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism).

Nowym osiągnięciem wynikającym z badań dotyczących *Gremmeniella abietina* było stwierdzenie obecności w Polsce typu STT grzyba do tej pory wyróżnianego tylko w krajach skandynawskich w rejonach z grubą pokrywą śnieżną (Kraj, Kowalski 2008a). Typ STT stanowił około 10% badanych osobników. Głównym jednak sprawcą zamierania pędów sosny w Polsce jest typ LTT. Na podstawie markerów RAMS stwierdzono wysoki między i wewnątrzpopulacyjny polimorfizm genetyczny *G. abietina*. Analizy oparte na markerach RAMS i PCR-RFLP wykazały, że głównymi czynnikami warunkującymi genetyczne zróżnicowanie patogena była specyficzność w stosunku do gatunku rośliny żywiciela (*Pinus jeffreyi*, *Pinus nigra*, *Pinus armandii*, *Pinus sylvestris*) i warunki klimatyczne, natomiast mniejszy wpływ miała odległość geograficzna między miejscami pochodzenia izolatów (Kraj, Kowalski 2008a; Kraj 2009). Na podstawie polimorfizmu genetycznego genu dehydrogenazy aldehydu glicerynowego (GPD), podjednostki mitochondrialnego rDNA (mtSSU rDNA) i fragmentu r-DNA obejmującego ITS1, 5.8S i ITS2 określonego metodą PCR-RFLP wykazano genetyczne oddalenie izolatów *Brunchorstia pinea* var. *cembrae* od izolatów *G. abietina* otrzymanych z badanych gatunków sosny (Kraj 2009).

Wyniki analiz przedstawiono w następującej pracach:

**Kraj W.**, Kowalski T. 2008a. Genetic variation in Polish strains of *Gremmeniella abietina*. *Forest Pathology* 38: 203-217.

**Kraj W.**, Kowalski T. 2008b. Evaluation of genetic diversity of polish strains of *Gremmeniella abietina* – agent causing pine shoots to die (*Pinus* spp.). Book of Abstracts. XV FESPB Congress, Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon – France, 17-21 July 2006.

**Kraj W.** 2009. Genetic polymorphism of Polish strains of *Gremmeniella abietina* and *Brunchorstia pinea* var. *cembrae*. *Dendrobiology* 61: 13-21.

Stwierdzono wysoką zmienność genetyczną *Sclerophoma pythiophila*. Zróżnicowanie genetyczne uzależnione było od odległości geograficznej i warunków klimatycznych miejsc pochodzenia izolatów. Wykazano większe podobieństwo genetyczne izolatów w południowej Polsce w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z Polski północnej. Stwierdzono korelację między procentowym udziałem polimorficznych loci a średnią roczną temperaturą i liczbą dni z pokrywą śnieżną lokalizacji pochodzenia izolatów. Analiza zróżnicowania i struktury genetycznej izolatów *Sclerophoma pythiophila* uzyskanych z igieł i pędów *Pinus sylvestris*

wykazujących różne objawy chorobowe lub objawy uszkodzeń spowodowanych przez przyszczarki *Contarinia baeri* lub *Thecodiplosis brachyntera* umożliwiła wyróżnienie blisko spokrewnionych izolatów grzyba związanych z uszkodzeniem igieł przez owady (Kraj i in. 2009). Stwierdzono różnice genetyczne w populacjach *S. pythiophila* powiązanych z różnymi typami symptomów chorobowych lub uszkodzeń przez owady.

Wyniki analiz przedstawiono w następującej pracach:

**Kraj W.** 2009. Differentiation and genetic structure of *Sclerophoma pythiophila* strains on *Pinus sylvestris* in Poland. *Journal of Phytopathology*, 157: 400-406.

**Kraj W.,** Kowalski T., Zarek M. 2009. Differentiation and genetic structure of *Sclerophoma pythiophila* (Corda) v. Hoehn. strains associated with various damage and disease symptoms on *Pinus sylvestris* L. *Acta Agrobotanica* 62: 57-65.

Na podstawie rozkładu częstotliwości markerów RAMS i PCR-RFLP wyróżniono dwie grupy izolatów *Cenangium ferruginosum*, oznaczonych jako A i B, wykazujące istotne różnice pod względem zmienności wewnątrzpopulacyjnej (dane nie publikowane). Stwierdzono charakterystyczne dla tych grup izolatów markery RAMS i PCR-RFLP pozwalające na ich identyfikację. Analiza częstości występowania markerów PCR-RFLP wykazała różnice między grupami A i B izolatów *Cenangium ferruginosum*, populacjami grzyba i gatunkami żywiciela (*Pinus sylvestris* i *Pinus nigra*) pod względem udziału polimorficznych loci. Z punktu widzenia fitopatologii do istotnych należy stwierdzenie występowania na terenie Polski dwóch typów *Cenangium ferruginosum*. Określenie roli poszczególnych typów w powodowaniu chorób pędów sosny wymagały dalszych odpowiednio ukierunkowanych badań. Badania takie oparte o wybrane sekwencje DNA z zastosowaniem izolatów zebranych z obszaru Polski zostały zakończone w ostatnim czasie. Manuskrypt publikacji jest w przygotowaniu i zostanie złożony w 2017 roku.



***Badanie nad bioróżnorodnością grzybów izolowanych z zamierających jesionów (*Fraxinus excelsior* L.), identyfikacją markerów molekularnych związanych z odpornością jesionu na zamieranie i biochemicznymi podstawami tej odporności***

W latach 2008 – 2015 jako kierownik lub główny wykonawca zrealizowałem trzy projekty badawcze dotyczące zamierania jesionu (*Fraxinus excelsior* L.).

1. Kierowałem grantem badawczym przyznany przez Narodowe Centrum Nauki pt: „Wieloaspektowe badania nad zróżnicowaniem genetycznym grzybów uczestniczących w procesie zamierania jesionu”.
2. Kierowałem częścią projektu finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych pt: „Ustalenie przyczyn i uwarunkowań zamierania jesionów i jaworów dla wypracowania podstaw postępowania hodowlano – ochronnego” obejmującą badania w zakresie: a) identyfikacji molekularnych markerów odporności jesionu na zamieranie, b) biochemicznych podstaw odporności tego gatunku na zamieranie i c) fitotoksyczności wiridiolu – wtórnego metabolitu wytwarzanego przez *H. fraxineus* - sprawcę zamierania jesionu
3. Byłem głównym wykonawcą projektu badawczego pt: „Wybrane aspekty etiologii i uwarunkowań procesu zamierania jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) z zastosowaniem metod klasycznych i molekularnych”.

Ad.1. Celem naukowym projektu było zbadanie zróżnicowania genetycznego, w połączeniu z badaniami morfologicznymi, grzybów izolowanych z jesionów na terenie Polski należących do następujących rodzajów: *Chalara/Hymenoscyphus*, *Diplodia/Botryosphaeria* oraz *Phomopsis/Diaporthes*. Gatunki grzybów były identyfikowane na podstawie cech morfologicznych i sekwencji rybosomalnego DNA (ITS1-5.8S-ITS2). Stwierdzono wysoką zmienność genetyczną *Chalara fraxinea*, głównego sprawcy zamierania jesionu, której poziom w małym stopniu uzależniony był od lokalizacji geograficznej, natomiast zależał głównie od związanych z wysokością nad poziom morza warunków klimatycznych (Kraj i in. 2012). Przeprowadzone badania są jedynymi, w których stwierdzono wpływ warunków klimatycznych na zmienność genetyczną *Chalara fraxinea* i udowodniono istnienie struktury genetycznej populacji grzyba. Na podstawie braku identycznych haplotypów grzyba i braku kiełkowania konidiów stwierdzono, że jedynym sposobem jego rozmnażania jest tworzenie

askospor. Z tego powodu podjęto badania nad zmiennością genetyczną izolatów otrzymanych z askospor. Stwierdzono, że w zamierających drzewostanach jesionu obecny jest jedynie patogeniczny grzyb *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Jednocześnie wykazano brak obecności zbliżonego morfologicznie grzyba *Hymenoscyphus albidus* będącego saprotrofem rozwijającym się na opadłych liściach jesionu i niezwiązanego z chorobą. Potwierdzono wykazaną dla *Chalara fraxinea* korelację między wewnątrzpopulacyjną zmiennością a wysokością nad poziom morza miejsc położenia populacji. Stwierdzono, że zmienność genetyczna izolatów otrzymanych z askospor (Kraj, Kowalski 2014) była większa od zmienności genetycznej izolatów otrzymanych z nekroz na pędach (Kraj et al. 2012). Możliwą przyczyną różnic był fakt, że izolaty pochodzące z askospor reprezentowały poziom wewnątrzpopulacyjnej zmienności genetycznej przed selekcją wynikającą z interakcji grzyb – roślina. Zmienność populacji z nekroz była charakterystyczna dla izolatów o większej patogeniczności, zdolnych do infekcji rośliny gospodarza.

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W.**, Zarek M., Kowalski T. 2012. Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Mycological Progress* 11: 37-45.

Kowalski T., **Kraj W.**, Szeszycki T. 2012. Badania nad zamieraniem jesionu w drzewostanach Nadleśnictwa Rokita. *Acta Agraria et Silvestria, Ser. Silvestris* 50: 3-22.

**Kraj W.**, Kowalski T. 2014. Genetic variability of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on ash leaf rachises in leaf litter of forest stands in Poland. *Journal of Phytopathology*. 162: 218-227.

Zarek M., **Kraj W.** 2010. Genetic diversity of polish isolates of *Hymenoscyphus*, the teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Book of Abstracts. XVII FESPB Congress, Federation of European Societies of Plant Biology, Walencja – Spain, 04-09 July 2010.*

Gil W., Kowalski T., **Kraj W.**, Zachara T., Łukaszewicz J., Paluch R., Nowakowska J.A., Oszako T. 2017. Ash dieback in Poland – history of the phenomenon and possibilities of its limitation w: *Dieback of European Ash (Fraxinus spp. - Consequences and Guidelines for Sustainable Management. The Report on European Cooperation in Science & Technology (COST), Action FP1103 FRAXBACK.* Eds. Vasaitis R., Enderle R. SLU Service/Repro, Uppsala.

Badania nad *Diplodia mutila* prezentują po raz pierwszy molekularną charakterystykę tego gatunku grzyba pochodzącego z pędów *F. excelsior* z objawami zamierania (Kraj i in., 2013). Stwierdzono istnienie specyficzności badanych izolatów w stosunku do gatunku rośliny gospodarza. Wykazano występowanie form grzyba różniących się genetycznie i pod względem infekowanych gatunków, ale nie różniących się morfologicznie. Zmienność wewnątrzpopulacyjna *D. mutila* była wysoka i wzrastała wraz z natężeniem związanych z wysokością nad poziom morza niekorzystnych cech klimatu. Stwierdzono zależność odległości genetycznej między populacjami od ich odległości geograficznej. Warunki klimatyczne i odległość geograficzna były źródłem struktury genetycznej populacji *D. mutila* na terenie Polski.

Na podstawie analizy PCR-RFLP sekwencji kalmoduliny, czynnika elongacyjnego alfa i syntazy chitynowej *D. mutila* stwierdzono niewielką wewnątrzpopulacyjną i dużą międzypopulacyjną zmienność genetyczną. Wykazano, że badane populacje tworzą dwie główne grupy: jedną obejmującą populacje z północno-zachodniej Polski i drugą, w skład której wchodzi populacje z wyżynnych i podgórskich regionów środkowej i południowej Polski.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy:

**Kraj W., Kowalski T., Zarek M. 2013.** Structure and genetic variation of *Diplodia mutila* on decaying ashes (*Fraxinus excelsior* L.) in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 95: 499-507.

Analiza sekwencji ITS1-5.8S-ITS2 pozwoliła na zidentyfikowanie ośmiu gatunków grzybów z rodzaju *Phomopsis/Diaporthe* występujących na pędach zamierających jesionów. W oparciu o analizę UPGMA tych sekwencji izolaty (gatunki *Phomopsis/Diaporthe*) podzielono na trzy grupy. Pierwsza obejmowała izolaty tworzące trzy podgrupy: A) *Diaporthe conorum* i *Phomopsis cotoneastri*, B) *D. eres* i *P. quercina* oraz C) *P. phaseolorum*. Druga obejmowała izolaty zidentyfikowane jako *P. vaccini* i *P. eucomicola*, natomiast trzecia izolaty *P. viticola*. Analiza częstotliwości występowania poszczególnych gatunków *Phomopsis/Diaporthe* w badanych drzewostanach stwierdza ich nierównomierne rozmieszczenie uzależnione od geograficznej lokalizacji drzewostanu. *Diaporthe conorum* występował w regionach nadmorskim i wyżynnym Polski, *Diaporthe viticola* jedynie w regionie nadmorskim, natomiast częstotliwość występowania pozostałych gatunków grzyba rosła w miarę przesuwania się na południe Polski w kierunku regionów wyżynnych i

podgórskich.

Przy pomocy markerów RAMS stwierdzono, że gatunki *Phomopsis/Diaporthes* wykazywały dużą, zależną od pochodzenia geograficznego badanych izolatów, genetyczną zmienność zarówno wewnątrz jak i międzygatunkową. Mniejszą zmienność genetyczną wykazano przy użyciu markerów PCR-RFLP genów kalmoduliny, czynnika elongacyjnego alfa i syntazy chitynowej. Na podstawie częstotliwości występowania zarówno markerów RAMS jak i markerów PCR-RFLP stwierdzono, że spośród zidentyfikowanych gatunków *Phomopsis/Diaporthes* najbardziej oddalonym od pozostałych okazał się *D. viticola*. Bardziej spokrewnione są pozostałe gatunki rodzaju *Phomopsis/Diaporthes*, szczególnie *P. quercina* i *P. vaccini*. Dane dotyczące *Phomopsis/Diaporthes* zostały przedstawione w sprawozdaniu merytorycznym z grantu złożonym w Narodowym Centrum Nauki. Badania nad rodzajem *Phomopsis/Diaporthes* były kontynuowane i zostały uzupełnione o analizę sekwencji kalmoduliny, czynnika elongacyjnego alfa i syntazy chitynowej, która potwierdziła wcześniejsze wnioski. Manuskrypt zostanie złożony do druku w 2017 roku.

Ad.2a. Identyfikację markerów molekularnych związanych z odpornością osobników jesionu na zamieranie przeprowadzono z zastosowaniem markerów RAPD i RAMS. Łącząc technikę RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) i RAMS (Random Amplified Microsatellites) oraz analizę zbiorczych prób segregantów (BSA – Bulk Segregant Analysis) zidentyfikowano markery powiązane z odpornością roślin na chorobę. W oparciu o markery RAPD/RAMS opracowano specyficzne markery SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), a następnie startery pozwalające na szybką i pewną identyfikację odpornych lub charakteryzujących się zwiększoną odpornością osobników jesionu. Markery wykazywały wysoką specyficzność dla danej populacji, jednak nie były w pełni specyficzne dla całego gatunku. Skuteczność identyfikacji odpornych (lub wrażliwych) osobników jesionu dla badanych populacji wynosiła od 93 do 100%. Otrzymane markery SCAR mogą być wykorzystane do selekcji odpornych na zamieranie osobników jesionu (Kowalski, Kraj 2012; Kowalski i in. 2012).

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

Kowalski T., **Kraj W.**, Szeszycki T. 2012. Badania nad zamieraniem jesionu w drzewostanach Nadleśnictwa Rokita. Acta Agraria et Silvestria, Ser. Silvestris 50: 3-22.

Kowalski T., **Kraj W.** 2012. Podsumowanie wyników i wnioski dla praktyki leśnej

opracowane na podstawie wyników realizacji tematu badawczego pt. Ustalenie przyczyn i uwarunkowań zamierania jesionów i jaworów dla wypracowania podstaw postępowania hodowlano – ochronnego. [http://www.lasy.gov.pl/publikacje/copy\\_of\\_gospodarka-lesna/prace-naukowe/ustalenie-przyczyn-i-uwarunkowan-zamierania-jesionow-i-jaworow-dla-wypracowania-podstaw-postepowania-hodowlano2013ochronnego/podsumowanie-wynikow-i-wnioski/at\\_download/file](http://www.lasy.gov.pl/publikacje/copy_of_gospodarka-lesna/prace-naukowe/ustalenie-przyczyn-i-uwarunkowan-zamierania-jesionow-i-jaworow-dla-wypracowania-podstaw-postepowania-hodowlano2013ochronnego/podsumowanie-wynikow-i-wnioski/at_download/file).

Ad 2b. Rośliny jesionu wykazały zróżnicowaną tolerancję na infekcję przez *Chalara fraxinea* wyrażoną długością nekroz na pędach. Na podstawie analizy statystycznej długości nekroz wprowadzono wskaźnik tolerancji osobników jesionu na infekcję. Osobniki jesionu o różnym wskaźniku tolerancji na infekcję wykazywały różnice pod względem biochemicznej reakcji na obecność patogena. Reakcja osobników jesionu na sztuczną inokulację patogenem była tym szybsza im bardziej tolerancyjne były osobniki jesionu. Stężenie reaktywnych form tlenu (nadtlenku wodoru i anionu nadadtlenkowego) i aktywność enzymów katalazy i dysmutazy nadadtlenkowej była tym większa im bardziej tolerancyjne na infekcję były osobniki jesionu. Bardziej odporne jesiony wykazywały szybszą syntezę i większą zawartość fenoli ogólnych i flawonoidów w stosunku do osobników bardziej wrażliwych na infekcję. Wyniki przedstawiono w sprawozdaniu złożonym w Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych (Kowalski, Kraj 2012) oraz na konferencji zorganizowanej w ramach akcji COST FP1103 w Malmö (Kraj, 2013).

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W.** 2013. Biochemical characterization of oxidative burst during ash (*Fraxinus excelsior* L.) infection by *Chalara fraxinea*. Frontiers in ash dieback research, 4-6<sup>th</sup> of September 2013, Malmö, Sweden.

([https://www.ippc.int/static/media/files/publications/en/2013/10/02/2013\\_ifqrg-11-10\\_fraxback\\_malmo\\_sweden\\_2013.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publications/en/2013/10/02/2013_ifqrg-11-10_fraxback_malmo_sweden_2013.pdf))

Kowalski T., **Kraj W.** 2012. Podsumowanie wyników i wnioski dla praktyki leśnej opracowane na podstawie wyników realizacji tematu badawczego pt. Ustalenie przyczyn i uwarunkowań zamierania jesionów i jaworów dla wypracowania podstaw postępowania hodowlano – ochronnego. [http://www.lasy.gov.pl/publikacje/copy\\_of\\_gospodarka-lesna/prace-naukowe/ustalenie-przyczyn-i-uwarunkowan-zamierania-jesionow-i-jaworow-dla-wypracowania-podstaw-postepowania-hodowlano2013ochronnego/podsumowanie-](http://www.lasy.gov.pl/publikacje/copy_of_gospodarka-lesna/prace-naukowe/ustalenie-przyczyn-i-uwarunkowan-zamierania-jesionow-i-jaworow-dla-wypracowania-podstaw-postepowania-hodowlano2013ochronnego/podsumowanie-)

wynikow-i-wnioski/at\_download/file.

Ad 2c. Uczestniczyłem w badaniach nad fitotoksycznością wiridiolu – wtórnego metabolitu wytwarzanego przez *Chalara fraxinea* (Grad i in. 2009). Za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektroskopii masowej stwierdzono, że wiridiol jest głównym związkiem krystalicznej substancji wytwarzanej w kulturach grzyba. Wykazano, że w związku z nierozpuszczalnością wiridiolu w wodzie skuteczną metodą aplikacji tego związku na pędy jesionu jest stosowanie pasty lanolinowej zawierającej wiridiol. Sadzonki jesionu, u których zastosowano wiridiol wykazywały pojawianie się nekrotycznych zmian na pędach co świadczy o fitotoksycznych właściwościach wiridiolu w stosunku do jesionu.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy:

Grad B., Kowalski T., **Kraj W.** 2009. Studies on secondary metabolite produced by *Chalara fraxinea* and its phytotoxic influence on *Fraxinus excelsior*. *Phytopathologia Polonica* 54: 61-69.

Gil W., Kowalski T., **Kraj W.**, Zachara T., Łukaszewicz J., Paluch R., Nowakowska J.A., Oszako T. **2017**. Ash dieback in Poland – history of the phenomenon and possibilities of its limitation w: Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp. - Consequences and Guidelines for Sustainable Management. The Report on European Cooperation in Science & Technology (COST), Action FP1103 FRAXBACK. Eds. Vasaitis R., Enderle R. SLU Service/Repro, Uppsala.

Ad 3. Brałem udział w projekcie badawczym, którego celem było określenie częstotliwości występowania *H. fraxineus* jako pierwotnej przyczyny zamierania jesionu oraz identyfikacja gatunków grzybów odnoszących korzyści z wcześniejszej infekcji pędów przez sprawcę zamierania jesionu. Celem projektu była również identyfikacja grzybów, które tworzą owocniki na zamarych wierzchołkowych częściach pędów będące głównym źródłem inokulum stwarzającym ryzyko dla stanu zdrowotnego jesionu (Kowalski i in. 2016). Identyfikację grzybów przeprowadzono metodami klasycznymi i molekularnymi. W projekcie określono znaczenie tych grzybów w procesie zamierania jesionu. Stwierdzono podobną bioróżnorodność gatunkową grzybów u osobników jesionu w badanych lokalizacjach. Najczęściej występującym grzybem w tworzących się nekrozach był *Hymenoscyphus*

*fraxineus*, co potwierdza główną rolę tego grzyba w zamieraniu jesionu. Oceniono wpływ infekcji pędów przez *H. fraxineus* na ich zasiedlanie przez inne gatunki grzybów i udział tych gatunków w powstawaniu nekroz na pędach. Stwierdzono, że często występującymi gatunkami grzybów były: *Alternaria alternata*, *Diaporthe eres*, *Diplodia mutila*, *Fusarium avenaceum* i *F. lateritium*, oraz gatunki z rodzaju *Phomopsis*. Gatunkami grzybów występujących na zamarych pędach i gałęziach były między innymi: *Diaporthe eres*, *Diplodia mutila*, *Lophiostoma corticola* i *Phomopsis* spp. Największy wpływ na strukturę gatunkową grzybów występujących w początkowych fazach tworzenia nekroz miały *Diplodia mutila* i *Fusarium avenaceum*, natomiast w zaawansowanym stadium rozwoju nekroz *D. mutila*, *D. eres* i gatunki z rodzaju *Phomopsis*. Przedstawiono wpływ uprzedniej infekcji pędów przez *H. fraxineus* na bioróżnorodność grzybów zasiedlających te pędy. Należały do nich głównie: *Alternaria*, *Fusarium*, *Phomopsis* i *Diplodia*.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy:

Kowalski T., **Kraj W.**, Bednarz B. **2016**. Fungi on stems and twigs in initial and advanced stages of dieback of European ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *European Journal of Forest Research* 135: 565-579.

Dla określenia roli gatunków grzybów (*Cytospora pruinosa*, *Diaporthe eres*, *Diplodia mutila*, *Fusarium avenaceus*, *F. lateritium*, *F. solani*) występujących wraz z *H. fraxineus* w nekrozach na ich rozwój przeprowadzono testy patogeniczności (Kowalski i in. 2017). Brak *H. fraxineus* w pędach infekowanych innymi grzybami potwierdzono metodą real-time PCR. Stwierdzono istotne różnice między wartościami indeksu patogeniczności badanych grzybów. Najbardziej patogenicznym grzybem był *H. fraxineus*, natomiast mniej patogenicznymi były *D. mutila* i *C. pruinosa*. Najmniejszymi wartościami indeksu patogeniczności charakteryzowały się *D. eres*, *Fusarium avenaceus*, *F. lateritium*, *F. solani*.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy:

Kowalski T., Bilański P., **Kraj W.** **2017**. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* DOI: 10.1111/ppa.12667.

### ***Badania nad wpływem kontrolowanej mikoryzacji na parametry fizjologiczne roślin***

Mikoryza ma bardzo istotne znaczenie dla czynności fizjologicznych, podwyższania produktywności roślin oraz ich odporności na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Drzewa rosnące w środowisku pozbawionym partnerów grzybowych wykazują zakłócenia fizjologiczno-rozwojowe, są bardziej narażone na niekorzystne czynniki środowiska i słabiej się rozwijają. Mikoryza korzystnie wpływa na gospodarkę wodną i mineralną rośliny, zwłaszcza na gospodarkę fosforanową oraz poziom barwników asymilacyjnych i gospodarkę hormonalną, co powoduje wzrost intensywności fotosyntezy i gospodarki węglowodanowej.

Brałem udział w projekcie naukowym finansowanym przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych pt: „Badania nad kształtowaniem odporności na wybrane czynniki chorobotwórcze, aktywność fizjologiczną i produkcję biomasy u sosny zwyczajnej poddanej i nie poddanej zabiegowi sterowanej mikoryzacji różnymi gatunkami grzybów ektomikoryzowych.” W badaniach tych za pomocą analiz biochemicznych igieł (barwniki asymilacyjne, białka i węglowodany) oceniono aktywność ektomikoryzową siewek sosny zwyczajnej kolonizowanych grzybami *Hebeloma crustuliniforme* i *Laccaria bicolor* i jej wpływ na stan fizjologiczny roślin. Stwierdzono, że pierwsze objawy rozwijającej się symbiozy pojawiały się szybciej u *H. crustuliniforme* (po około 1 miesiącu) niż u *L. bicolor* (po około 2 miesiącach). Na podstawie parametrów biochemicznych potwierdzono wcześniejszy i szybszy rozwój mikoryzy powodowanej przez *H. crustuliniforme* niż *L. bicolor*. Wykazano, że aktywność fizjologiczna inokulowanych siewek sosny była większa niż siewek nieinokulowanych. Po okresie negatywnego wpływu początkowego stadium rozwoju mikoryzy na zawartość barwników asymilacyjnych przyczyniała się ona do większej ich zawartości w igłach siewek sosny. Stwierdzono, że profil zmian i zawartość węglowodanów i białek w siewkach sosny zależał od gatunku grzyba i związanej z nim szybkości i stopnia rozwoju mikoryzy. Siewki inokulowane *H. crustuliniforme* w okresie rozwoju mikoryzy zawierały więcej chlorofilu i białek, jednak akumulowały mniej węglowodanów niż siewki inokulowane *L. bicolor*.

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W.** 2007. Dynamika zawartości barwników fotosyntetycznych u siewek sosny zwyczajnej, szczepionych i nieszczepionych grzybami ektomikoryzowymi w: Kowalski S. ed. Ektomikoryzy. Nowe biotechnologie w polskim szkółkarstwie leśnym, Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa 2007, 187 - 198.



**Kraj W., Grad B.** 2013. Seasonal dynamics of photosynthetic pigment, protein and carbohydrate contents in *Pinus sylvestris* L. seedlings inoculated with *Hebeloma crustuliniforme* and *Laccaria bicolor*. *Journal of Plant Nutrition*. 36: 633-650.

***Badania taksonomiczno-mykologiczne sprawców chorób występujących w drzewostanach iglastych***

Moją wiedzę i doświadczenie w zakresie biologii molekularnej i biochemii wykorzystałem również w pracach dotyczących identyfikacji i badania bioróżnorodności grzybów patogenicznych realizowanych w ramach projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. "Badania taksonomiczno-mykologiczne dla wyjaśnienia etiologii i elementów biologii sprawców objawów chorobowych występujących/ obserwowanych w drzewostanach iglastych południowej Polski", którego byłem głównym wykonawcą. W ramach tego projektu zrealizowałem dwa zadania badawcze dotyczące *Dothistroma septospora* i *Heterobasidion annosum*.

Celem badań nad *Dothistroma septospora* było określenie wewnątrzpopulacyjnej zmienności grzyba i jej przestrzennej struktury w obrębie pierwotnych ognisk infekcji (Kraj, Kowalski 2013). Dla oceny hipotezy o losowym rozmieszczeniu izolatów grzyba przy użyciu markerów molekularnych, testu Mantela i autokorelacyjnej analizy przestrzennej wykonałem analizę rozprzestrzeniania się grzyba, określiłem strukturę przestrzenną jego populacji i zweryfikowałem hipotezę o losowym rozmieszczeniu jego osobników. Badania potwierdziły istnienie zależności między odległością geograficzną a genetyczną między izolatami grzyba na małym obszarze wokół wybranych drzew. Zależność ta zanikała przy większych odległościach między izolatami przekraczających 8-10 m. Należy przypuszczać, że ma to związek z niewielką odległością na jaką migrują zarodniki konidialne grzyba (Kraj, Kowalski 2013). Stwierdzony wysoki poziom wewnątrzpopulacyjnej zmienności świadczy o dużym udziale zarodników workowych w rozmnażaniu grzyba.

Badania nad *Heterobasidion annosum* miały na celu opracowanie molekularnej metody identyfikacji intersterylnych grup (gatunków) *Heterobasidion annosum* s.l.: *H. annosum*, *H. parviporum* i *H. abietinum*. W metodzie tej zastosowano markery PCR-RFLP oparte na genach lakazy i zależnej od jonów manganu peroksydazy. Stwierdzono, że charakterystyczne dla gatunków *Heterobasidion* długości genów MNP1a i MNP2 peroksydazy pozwalają na ich odróżnienie (Kraj, Kowalski 2010). Na podstawie monomorficznych markerów uzyskanych w

wyniku trawienia genów lakazy i peroksydazy zidentyfikowano gatunki grzyba wyizolowane z jedenastu gatunków drzew i krzewów leśnych. Badania wykazały obecność *H. annosum* s.s. na największej liczbie badanych gatunków drzew i krzewów. Jest to prawdopodobnie związane z tym, że drzewostany *Pinus sylvestris* stanowią około 70% powierzchni polskich lasów. *H. parviporum* stwierdzono głównie na *Picea abies* i *Abies alba*. Po raz pierwszy w Polsce stwierdzono występowanie *H. parviporum* na *Alnus incana*. Najrzadszym gatunkiem grzyba był *H. abietinum*, który występuje głównie w południowej Polsce i charakteryzuje się najwęższym zakresem gatunków roślin gospodarzy.

Wyniki badań opublikowano w następujących pracach:

**Kraj W., Kowalski T. 2013.** Microspatial genetic diversity of *Dothistroma septosporum*. *Forest Pathology* 43: 42-50.

**Kraj W., Kowalski T. 2010.** Identification of *Heterobasidion* spp. in Poland by RFLP analysis of laccase and manganese dependent peroxidase. *Dendrobiology* 63: 11-19.

## **Moje wybrane plany na przyszłość**

W najbliższej przyszłości planuję kontynuować badania dotyczące jesiennego starzenia liści buka. Aktualnie prowadzone są analizy w zakresie zmian metabolicznych u populacji zlokalizowanych w różnych warunkach klimatycznych. Celem tych badań jest odpowiedź na pytanie jak buk aklimatyzuje się do zróżnicowanych warunków klimatycznych. Z pomocą metod biochemicznych i molekularnych takich jak analiza aktywności enzymatycznej, analiza transkryptomu, ekspresja genów, porównanie sekwencji DNA pochodzących od osobników różniących się cechami fenologicznymi określone zostaną molekularne podstawy fenologicznych cech tych osobników i kontroli procesu starzenia liści. Mam nadzieję na realizację tych celów dzięki zgromadzonej do tej pory wiedzy, doświadczeniu oraz dysponowaniu powierzchniami badawczymi i osobnikami uprawianymi w kontrolowanych warunkach.

Planuję również realizację projektu mającego na celu określenie biochemicznych i molekularnych podstaw odporności jesionu na zamieranie. Dzięki realizacji projektu badawczego finansowanego przez Generalną Dyрекcję Lasów Państwowych dysponuję materiałem badawczym (powierzchnią doświadczalną założoną w pobliżu Krakowa jak i osobnikami, których odporność na zamieranie była wcześniej testowana) oraz markerami SCAR pozwalającymi na rozpoznanie odpornych na zamieranie osobników jesionu. Materiał ten zostanie wykorzystany w analizach biochemicznych i molekularnych (m. in. analiza transkryptomu, ekspresja genów, określenie różnic sekwencji DNA między osobnikami różniącymi się odpornością na zamieranie).

## **7. Działalność organizacyjna i tworzenie warsztatu pracy**

Zacząłem pracować na Wydziale Leśnym Akademii Rolniczej/Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie w nowo tworzonej jednostce (Zakładzie Fizjologii Drzew Leśnych), której celem było prowadzenie zajęć dydaktycznych i badań naukowych w zakresie fizjologii i biochemii roślin drzewiastych. Ze względu na brak odpowiedniego laboratorium na Wydziale Leśnym część doświadczalną pracy doktorskiej wykonałem w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Moje przekonanie o znaczeniu rozwoju fizjologii, biochemii i biologii molekularnej dla nauk leśnych, a w szczególności dla Wydziału Leśnego w Krakowie i w związku z tym konieczności utworzenia odpowiedniej bazy aparaturowej realizowałem poprzez mój główny udział w projektowaniu i wyposażaniu laboratorium. Po obronie pracy doktorskiej złożyłem w latach 1999 – 2003 i w roku 2010 wnioski o dotację do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz do Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej, których celem było uzyskanie dotacji na organizację laboratorium fizjologii i biologii molekularnej roślin drzewiastych. Wszystkie złożone wnioski zostały rozpatrzone pozytywnie dzięki czemu w powstałym laboratorium wykonywane są prace naukowe i kształceni są studenci Wydziału Leśnego. Powstałe w 2003 roku laboratorium umożliwiło realizowanie projektów badawczych w zakresie fizjologii, biochemii i biologii molekularnej drzew leśnych i grzybów. W laboratorium tym zrealizowane zostały wszystkie projekty badawcze, w których byłem kierownikiem lub głównym wykonawcą w zakresie badań fizjologicznych, biochemicznych i biologii molekularnej.

Nadzorowałem również wyposażanie sali ćwiczeń dla prowadzonych przez Zakład Fizjologii Roślin Drzewiastych, a następnie Zakład Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew przedmiotów: Fizjologia Roślin Drzewiastych i Chemia.

W latach 2012-2015 byłem członkiem Komitetu Zarządzającego (Management Committee Member) akcji COST nr FP1103 pt: „Fraxinus dieback in Europe: elaborating guidelines and strategies for sustainable management (FRAXBACK)”.

Dwukrotnie byłem członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej (2002/2003, 2014/2015).

Od 2005 roku jestem członkiem American Society of Plant Biologists.

## **8. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska**

Od początku pracy na Akademii Rolniczej/Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie prowadzę ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu Fizjologia Roślin Drzewiastych w pełnym wymiarze pensum dydaktycznego obowiązującego na Uniwersytecie Rolniczym. Organizowałem ćwiczenia laboratoryjne z tego przedmiotu w nowo powstałej na Wydziale Leśnym w Krakowie jednostce dydaktycznej. Początkowo przedmiot obejmował zakres Fizjologia Roślin Drzewiastych, natomiast po kilku latach jego zakres został rozszerzony o chemię organiczną i biochemię. Od roku 1998 jestem koordynatorem i prowadzę również wykłady z przedmiotu Fizjologia Roślin Drzewiastych dla studentów Wydziału Leśnego, specjalności Ochrona Zasobów Leśnych (wykłady 30 godzin, ćwiczenia 40 godzin), a od roku 2005 również dla specjalności Gospodarka Leśna (wykłady 25 godzin, ćwiczenia 30 godzin). W związku ze zleceniem mi przez Radę Wydziału prowadzenia powyższych wykładów opracowałem nowy program przedmiotu, a następnie brałem udział w jego istotnej modyfikacji spowodowanej zmianą programu studiów i następnie wprowadzeniem studiów dwustopniowych. Prowadzę również ćwiczenia laboratoryjne z Fizjologii Roślin Drzewiastych na studiach niestacjonarnych (ćwiczenia, 20 godzin). Opracowałem program i prowadziłem elektyw pt. "Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej" (wykład, 15 godzin). Wraz z Panią dr inż. Katarzyną Nawrot-Chorabik opracowałem program przedmiotu do wyboru pt. "Podstawy biologii molekularnej i biotechnologii roślin drzewiastych" (wykłady 15 godzin, ćwiczenia 15 godzin). W związku z utworzeniem nowego kierunku na Wydziale Leśnym - Zarządzanie Środowiskiem Przyrodniczym w roku 2013 opracowałem program i prowadziłem przedmiot "Fizjologia i biochemia stresu roślin" (wykłady 15 godzin, ćwiczenia 30 godzin). W roku 2016 w związku z tworzonym kierunkiem Przetwórstwo drewna opracowałem przedmiot pt. "Techniki molekularne w diagnostyce drewna" (wykłady 10 godzin, ćwiczenia 20 godzin).

Wygłaszałem seminaria dla studentów i pracowników Wydziału Leśnego z zakresu zastosowania metod biologii molekularnej w badaniach drzew leśnych.

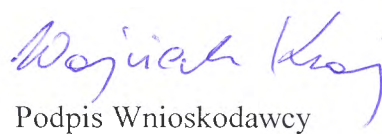
Wygłaszałem również wykłady poświęcone zastosowaniu markerów molekularnych i innych metod biologii molekularnej i biochemii na seminarium naukowym w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku i na posiedzeniu Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego.

Szczegółowy wykaz opracowanych/koordynowanych przedmiotów i wykładów na posiedzeniach naukowych przedstawia załącznik 6.

Przeszkoliłem doktorantów, pracowników technicznych Zakładu Fizjologii Roślin Drzewiastych/Zakładu Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew oraz jedną osobę odbywającą staż w naszym Zakładzie w zakresie stosowania metod biologii molekularnej i biochemii w badaniach naukowych.

Byłem promotorem 6 prac magisterskich i 3 prac inżynierskich w zakresie Fizjologii Roślin Drzewiastych. Recenzowałem 7 prac inżynierskich.

Kraków, 2017-05-25

  
Podpis Wnioskodawcy