

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
Wydział Leśny

Anna Bieniasz

**Morfo-anatomiczna charakterystyka procesu powstawania twardzieli  
w pniach zamierających jesionów (*Fraxinus excelsior* L.)**

**Morpho-anatomical characteristics of the heartwood formation process  
at dying ash stems (*Fraxinus excelsior* L.)**

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca napisana pod kierunkiem  
dr hab. Mireli Tulik, prof. SGGW  
Instytut Nauk Leśnych SGGW w Warszawie

Warszawa, 2023

poprawne zostaje dostarczone do sekretariatu  
w dniu 15.09.2023 r.

SEKRETARIAT INSTYTUTU  
NAUK LEŚNYCH

/ mgr Agnieszka Daniluk /

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
RADA DYSCYPLINY  
NAUKI LEŚNE  
02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159  
tel.: 22 59-32010, e-mail: rdnl@sggw.pl

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... 19.09.2023.....

Podpis promotora pracy..... *M. Sulik*.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... 19.09.2023.....

Podpis promotora pracy..... *Autorek*..... *Anna Bevilacqua*.....

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data.....

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis promotora pracy.....



## **Streszczenie**

Praca doktorska składa się z trzech monotematycznych artykułów naukowych – dwóch prac badawczych i jednej przeglądowej. Badania dotyczyły procesu powstawania twardzieli i związanymi z tym procesem, modyfikacjami budowy anatomicznej drewna istotnych gatunków lasotwórczych o znacząco różniących się od siebie cechach biologicznych – sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.). Praca o charakterze przeglądowym przybliży badania prowadzone nad twardzielą na różnych poziomach organizacji życia drzew.

W pracach nad drewnem wymienionych gatunków podjęto próby wyznaczenia twardzieli na podstawie badań anatomicznych polegających na identyfikacji żywych komórek miękiszowych drewna w kolejnych słojach rocznych. Określono długość życia komórek miękiszowych, która u sosny wynosi 42 lata, a u jesionu nawet 90 lat. Nie stwierdzono twardzieli na podstawie analizy mikroskopowej drewna jesionu, pomimo widocznego zabarwienia wynikającego z obecności substancji twardzielowych. Ponadto, już w bieżącym przyroście rocznym zaobserwowano z lignifikowane ściany komórkowe komórek miękiszu drewna jesionu. Badania te wskazują na wyraźne rozdzielenie czasowe i przestrzenne procesów rozwojowych, zarówno u drzew zdrowych jak i z symptomami zamierania. Natomiast u sosny procesy te zachodzą zwykle w tym samym czasie. Wyniki uzyskanych prac wskazują na rolę informacji pozycyjnej w realizacji programowanej śmierci komórek miękiszowych drewna.

**Słowa kluczowe:** drzewa leśne, komórki miękiszowe, programowana śmierć komórki, twardziel

## **Abstract**

The following dissertation consists of three scientific papers – two research articles and one review paper. Investigations concern the heartwood formation process and related anatomical structure modifications in crucial forest-forming domestic tree species, that perform biological features distinct from each other: Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) and European ash (*Fraxinus excelsior* L.) The review paper presents research on heartwood formation at different levels of life organization.

Aforementioned wood species investigation was focused on heartwood identification consisting of the detection of living nuclei in xylem parenchyma cells. The longevity of these cells was determined and they reached the age of 42 at pine and even 90 at ash. While microscopic analysis, heartwood was not found in the ash wood, although a specific colour of the wood was visible, due to the presence of heartwood substances. Furthermore, the lignified xylem parenchyma cell walls were observed in the current tree increment of the ash wood. Thus, developmental processes are remote in time and space both in healthy and dying trees. The results obtained in both works indicate the role of positional information at programmed cell death of xylem parenchyma cells.

**Keywords:** forest trees, parenchyma cells, programmed cell death, heartwood



## SPIS TREŚCI

1. Autoprezentacja z opisem dorobku naukowego.....	9
2. Forma rozprawy doktorskiej i dane bibliometryczne .....	11
3. Wstęp.....	13
4. Prezentacja publikacji składających się na rozprawę doktorską.....	14
5. Perspektywy dalszych badań.....	21
6. Spis literatury.....	22
7. Załączniki.....	26





## 1. Autoprezentacja z opisem dorobku naukowego

Poniżej przedstawiam mój dorobek naukowy osiągnięty w czasie trwania studiów doktoranckich, które realizowałam przy Wydziale Leśnym SGGW.

Wykaz publikacji bez uwzględnienia prac będących podstawą pracy doktorskiej napisanych w ramach współpracy krajowej i międzynarodowej:

<sup>1</sup>Bieniasz A., Lachowicz H., Buraczyk W., Moskalik T. 2017. Jakość techniczna drewna 35-letnich świerków (*Picea abies* L. H. Karst) rosnących na powierzchni proveniencyjnej w LZD Rogów, Sylwan 161 (10): 851–860. DOI: 10.26202/sylwan.2017084

IF czasopisma: 0,623, punkty MNiSW: 15

<sup>2</sup>Lachowicz H., Bieniasz A., Wojtan R. 2019. Variability in the basic density of silver birch wood in Poland, Silva Fennica, 53(1), ID 9968, DOI:10.14214/sf.9968

IF czasopisma: 1,82, punkty MNiSW: 70

<sup>3</sup>Accastello C., Bieniasz A., Blaško R., Lula M., Pszeny D., Sallustio L., Simunovic N., Vošvrđová N., Speelman M. 2019. Conflicting demands on the natural resources in Northern Sweden: A participatory scenario development study. Journal of Environmental Assessment Policy and Management 21(03):1950017, DOI: 10.1142/S1464333219500170

IF dla roku 2019: 0,52, punkty MEiN: 40

<sup>4</sup>Vacek Z., Vacek S., Cukor J., Bulusek D., Slavik M., Lukacik I., Stefancik I., Sitkova Z., Esen D., Ripullone F., Yildiz O., Sarginci M., D'Andrea G., weatherall A., Simunek V., Hajek V., Kralicek I., Prausova R., Bieniasz A., Prokupkova A., Putalova T. 2022. Dendrochronological data from twelve countries proved definite growth response of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) to climate courses across its distribution range. Central European Forestry Journal 68 (3): 139-153, DOI: 10.2478/forj-2022-0003

IF dla roku 2022: 1,6, punkty MEiN 20

Liczby punktów podano dla roku publikacji każdego z artykułów.

Jestem także autorem korespondencyjnym dwóch pierwszych wyżej wymienionych artykułów.

**Łączna liczba punktów: 145**

**Sumaryczny IF czasopism: 4,563**

### Stáže i szkolenia:

- LIFE GENMON Summer School on scientific writing and Forest genetic monitoring knowledge transfer into practice & CAPABAL TRAINING SCHOOL organizowanej przez Slovenian Forestry Institute we współpracy z EVOLTREE network – udział w dwóch edycjach w 2017 i 2018 roku,

- Szkoła Letnia ELLS Summer school: Conflicting demands in European forests: a wicked problem? Gällivare, Sweden, 2018,
- Staż w Mendel University w Brnie, w Republice Czeskiej, zrealizowany w ramach Własnego Funduszu Stypendialnego SGGW, 2020,
- Staż w Mendel University w Brnie w Republice Czeskiej, w ramach projektu NAWA „PROM”, 2021.

Członkostwo w organizacjach naukowych:

- Polskie Towarzystwo Botaniczne, Sekcja Struktury i Rozwoju Roślin,
- Q-NET – exchanging on Quantitative Wood Anatomy,
- Association for Tree-Ring Research.

Pozostałe:

złożenie wniosku badawczego o grant NCN w ramach konkursu „Preludium 16” – zakwalifikowanie do I etapu oceny merytorycznej.

## 2. Forma rozprawy doktorskiej i dane bibliometryczne

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech artykułów monotematycznych, opublikowanych w czasopiśmie naukowych przypisanych do dyscypliny nauki leśne. Trzeci artykuł ukazał się początkiem bieżącego roku ze względu na cykl wydawniczy przyjęty przez wydawcę. Jego problematyka przyczyniła się do sformułowania tytułu przewodniego pracy doktorskiej.

- 1) Tulik M., Jura-Morawiec J., Bieniasz A., Marciszewska K. 2019. How long do wood parenchyma cells live in the stem of a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)? Studies on cell nuclei status along the radial and longitudinal stem axes. *Forests* 10(11), 977; DOI:10.3390/f10110977  
Impact Factor: 2,36 (podano dla roku 2019)  
Punkty 100 (punktacja MNiSW dla roku 2019)
- 2) Bieniasz A., Tulik M. 2020. Strefa twardzieli w drewnie i proces jej powstawania. Heartwood zone and its formation process. *Sylvan* 164(6): 474-481, DOI:10.26202/sylvan.2020065  
Impact Factor: 0,624 (podano dla roku 2019)  
Punkty 40 (punktacja MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania)
- 3) Bieniasz A., Tulik M. 2022. The longest living xylem cells locked in lignified cell walls - the case of xylem parenchyma in European ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 64(2): 65–74, DOI: 10.24425/abcsb.2022.143383  
Impact Factor 1,3 (podano dla roku 2022)  
Punkty 70 (punktacja MEiN z 2023)

**Łączna liczba punktów: 210**

**Sumaryczny IF czasopism: 4,284**

### 3. Wstęp

Drewno powstaje w wyniku podziałów komórek merystematycznych kambium waskularnego, którego pochodne różnicują się na cewki, człony naczyniowe, włókna drzewne oraz komórki miękiszowe. Wszystkie z wymienionych komórek drewna realizują genetycznie zaprogramowany proces, określany jako programowana śmierć komórki w typie autofagii, z ang. vacuolar programmed cell death, w skrócie PCD (Kuriyama, Fukuda 2002, i in. 2014). Drewno w organizmie roślin drzewiastych pełni istotne role, przede wszystkim to tkanka odpowiedzialna za transport wody, zapewniająca mechaniczną wytrzymałość, czy też stanowiąca rezerwuar wysokoenergetycznych związków.

Wiele nowych informacji istotnych dla zrozumienia struktury i funkcji drewna - a tym samym ewolucji tej tkanki - pojawiło się w ciągu ostatnich 40 lat. Powstawanie twardzieli (zwane też twardzielowaniem) w kontekście anatomii drewna oraz zachodzących w drzewie procesów fizjologicznych, takich jak starzenie się drewna, jest w ostatnim czasie często poruszanym zagadnieniem w biologii drzew (Ren i in. 2023, Yin i in. 2022, Tulik i in. 2019). Uznawane jest ono za wtórny proces różnicowania się drewna u gatunków wytwarzających twardziel (Kampe, Magel 2013, Zheng-Hua, Zhong 2015). W rodzimej florze przedstawicielami tej grupy drzew są sosny, modrzewie, cisy, dęby, jesiony, wiązy i wierzby, posiadające zabarwioną twardziel oraz świerki i jodły z niezabarwioną twardzielią.

U tych drzew obwodową część drewna pnia zajmuje biel i tej części (strefie) przypisana jest funkcja przewodzenia wody (IAWA 1964). Twardziel uznaje się za wewnętrzną warstwę drewna, która w rosnącym drzewie nie zawiera już żywych komórek miękiszowych i jest pozbawiona materiału zapasowego (np. skrobi) bądź został on zamieniony na substancje twardzielowe (IAWA 1964). Oznacza to, że komórki miękiszowe obumierając inicjują proces twardzielowania, który postępuje wraz z kolejnymi przyrostami rocznymi, czyli centryfugalnie (uwzględniając kierunek względem środka) oraz bazypetalnie (uwzględniając kierunek względem szczytu) (Nagai i in. 2022). Strefa bielu, w której obserwuje się stopniowe obumieranie komórek miękiszowych, nazywana jest strefą przejściową (z ang. transition zone, intermediate wood) i właśnie w niej zachodzi transformacja bielu w twardziel (Nobuchi i in. 1984, Magel 2000). W strefie tej obserwuje się zwiększoną aktywność enzymów katalizujących reakcje powstawania metabolitów wtórnych (ekstraktów), co

świadczy o genetycznych mechanizmach regulujących proces twardzielowania (Beritognolo i in. 2002). Ponadto, formowanie twardzieli uznawane jest za mechanizm obronny przeciwko inwazji mikroorganizmów czy insektów, ze względu na toksyczne właściwości ekstraktów twardzielowych uwalnianych w tym procesie, takich jak np. polifenole (Bamber 1976).

Zwykle biel i twardziel identyfikowana jest makroskopowo - na podstawie zabarwienia drewna, które wynika z obecności substancji twardzielowych (Jakubowski, Koszewski 2004, Jakubowski i in. 2015, Arisandi i in. 2023). Rzadko uwzględnia się jednak poziom anatomiczny, a dokładniej żywotność komórek miękiszowych, na co wskazuje wspomniana wcześniej definicja IAWA. Zastosowanie badań mikroskopowych dla wyróżnienia twardzieli jest metodą skomplikowaną, ze względu na konieczność przygotowania skrawków drewna do obserwacji mikroskopowych, a także doboru odpowiedniej techniki barwienia, która zapewniłaby penetrację barwnika cytochemicznego przez ściany komórkowe. Jest to jednak metoda niezwykle precyzyjna pozwalająca określić długość życia komórek miękiszowych. Makroskopowa identyfikacja twardzieli jest stosunkowo szybką i łatwą metodą i ma ona duże znaczenie dla przemysłu drzewnego, gdyż drewno w części twardzielowej wykazuje inne właściwości niż w części bielastej. Twardziel cechuje się większą wytrzymałością, a także mniejszą zdolnością do nasycania. Obecność twardzieli nie jest jednak pożądana w przemyśle celulozowym i papierniczym.

Jak wspomniano, do funkcji komórek miększu drzewnego zalicza się magazynowanie substancji zapasowych, a także transport oraz magazynowanie wody. Komórki te są też elementem mechanizmu związanego z naprawą zapowietrzonych elementów przewodzących (Hillis 1987, Magel 2000, Nakaba i in. 2012, Tulik, Myśkow 2015). Ponadto, żywe komórki miękiszowe tkanki drzewnej mogą uczestniczyć w procesie fotosyntezy pnia (Pfanż i in. 2002), w reakcjach obronnych, zarówno jako element obrony konstytutywnej oraz indukowanej (Morris 2016), czy też uczestniczą w syntezie prekursorów ligniny wykorzystywanych przez elementy przewodzące do lignifikacji ścian (hipoteza dobrego sąsiada, Smith i in. 2013). Dają też wyraz upływającego czasu życia drzewa. Na podstawie danych literaturowych wnioskujemy, że długość życia komórek miękiszowych u różnych gatunków drzew jest bardzo zróżnicowana. W drewnie *Robinia pseudoaccacia* komórki miękiszowe żyją 4 lata (Nakaba i in. 2011), u *Populus sieboldii* x *P. Grandidentata* - 5 lat (Nakaba i in. 2012), 13 lat u *Cunninghamia lanceolata* (Song i in. 2011), 20 lat u *Pinus strobus* (Spicer, Holbrook 2007), 34,4 lata u *Pinus canariensis* (Climent i in. 1993), 42 lata u *Pinus sylvestris* (Tulik i in. 2019), 48 lat u *Fraxinus americana* (Spicer, Holbrook 2007).

Najdłuższą długość życia komórek miękiszowych odnotowano u *Rhododendron lapponicum* (L.) Wahlenb., tj. 200 lat (Spicer, Holbrook 2007; Morris 2016).

#### 4. Prezentacja publikacji składających się na rozprawę doktorską

Prace dotyczące formowania twardzieli w pniach prowadzone były na drewnie istotnych, rodzimych gatunków lasotwórczych, choć o zupełnie odmiennych cechach biologicznych.

Zgłębianie wiedzy nad tym procesem rozpoczęłam od badań nad drewnem sosny, którego struktura jest dość prosta, tzn. zbudowane jest ono z cewek, których udział sięga ok. 90% oraz z komórek miękiszowych. Mięksisz systemu osiowego jest nieliczny, komórki miękiszowe występują głównie w systemie radialnym tj. promieniach drzewnych. Wyniki tych badań zawiera praca:

Tulik M., Jura-Morawiec J., Bieniasz A., Marciszewska K. 2019. How long do wood parenchyma cells live in the stem of a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)? Studies on cell nuclei status along the radial and longitudinal stem axes. *Forests* 10(11), 977; DOI:10.3390/f10110977

Celem badań było opisanie przestrzennego rozmieszczenia twardzieli w pniu sosny na podstawie żywotności komórek miękiszowych, określonych obecnością jader komórkowych. Tą cechą również, po raz pierwszy, określono czas życia komórek miękiszowych. Za pomocą klasycznych metod barwienia jader komórkowych stwierdzono, że długość życia komórek miękiszowych pnia sosny wynosi 16 - 42 lata; najdłużej żyły komórki u podstawy pnia, a najkrócej u podstawy korony. Najwięcej słoików zawierających twardziel stwierdzono na wysokości 1,3–3,3 m, co świadczy o nierównomiernym rozmieszczeniu twardzieli w organie. Ponadto wykazano, że strefa przejściowa, w której obserwowano obumierający protoplast komórek miękiszowych obejmowała tylko jeden słoik roczny. Śmierć komórek miękiszowych poprzedzona była wytworzeniem wtórnej ściany komórkowej i lignifikacją. W części twardzielowej, w której wszystkie komórki miękiszowe były obumarłe, obserwowano ekstrakty nadające charakterystyczne zabarwienie tej części drewna. Otrzymane wyniki zgadzają się z postulatem istnienia pola morfogenetycznego, w którym komórki rozpoznają swoje położenie w tkance. Postawiono zatem hipotezę, że taka informacja o położeniu może być dostarczona do komórek w postaci gradientu stężenia morfogenu, zwłaszcza auksyny, co pozwala komórkom na dokończenie programu rozwojowego.

Szczegółowy przegląd literatury dotyczący procesu twardzielowania przedstawiony został w artykule:

Bieniasz A., Tulik M. 2020. Strefa twardzieli w drewnie i proces jej powstawania. Heartwood zone and its formation process. Sylwan 164(6): 474-481, DOI: 10.26202/sylvan.2020065

Praca ta podsumowuje dostępne w literaturze informacje dotyczące:

- a. biologicznego sensu funkcjonowania twardzieli,
- b. czynników wpływających na formowanie się twardzieli – wewnętrznych, które uruchamiane są na wszystkich poziomach organizacji drzewa, od molekularnego do organizmального. Opisano w nim hipotezy dotyczące odkładania się toksycznych, ubocznych produktów metabolizmu komórek czy wpływu wysokiej koncentracji CO<sub>2</sub> na powstawanie twardzieli. Zwrócono także uwagę na: regulację odpowiedniej ilości bielu, konieczność redukcji zawartości wody w centralnej części pnia, aktywność fitohormonów, wykształcenie mechanizmu obronnego, a także geny kodujące enzymy katalizujące reakcje biochemiczne oraz ekspresję genów strukturalnych. Spośród czynników zewnętrznych wyszczególniono elementy klimatu, żyzność siedliska i zabiegi hodowlane,
- c. morfologicznych zmian, jakim podlegają elementy drewna w procesie twardzielowania, m.in. blokowanie światła naczyń u liściastych, zamykanie wlotu do jamek u iglastych i ich inkrustację substancjami twardzielowymi,
- d. możliwych, dalszych kierunków badawczych, w tym przede wszystkim badań molekularnych, które pozwoliłyby „sterować” procesem tworzenia tkanki drzewnej o pożądanych właściwościach mechanicznych.

Wiadomo, że ściana komórek miękiszowych, w procesie PCD, ulega lignifikacji i trawiona jest treść cytoplazmatyczna. Przebieg tych procesów ze względu na zróżnicowaną długość życia komórek miękiszowych wydaje się być odmienny u różnych gatunków drzew. To założenie stało się przesłanką do podjęcia kolejnych badań nad procesem twardzielowania u jesionu wyniosłego. Wyniki badań opublikowano w:

Bieniasz A., Tulik M. 2022. The longest living xylem cells locked in lignified cell walls - the case of xylem parenchyma in European ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 64(2): 65–74, DOI: 10.24425/abcsb.2022.143383

U jesionu udział komórek miękiszowych w drewnie jest wyjątkowo duży w porównaniu do innych rodzimych gatunków drzew (Kokociński 2005). Według klasyfikacji Carlquista (1988), drewno jesionu zaliczane jest do typu 8, dla którego charakterystyczny jest większy wymiar naczyń drewna wczesnego i ich mniej liczne występowanie, w porównaniu do naczyń drewna późnego, które charakteryzują się mniejszym światłem, grubą ścianą komórkową i tworzeniem grup zorientowanych w kierunku radialnym. Ta cecha naczyń określana jest mianem ich dymorfizmu i jest podstawą klasyfikacji typu morfologicznego drewna jako pierścieniowo-naczyniowe. W drewnie jesionu płyty perforacyjne są proste, co oznacza, że ściana komórkowa pomiędzy nadległymi członami naczyniowymi podczas ich powstawania uległa całkowitej hydrolizie, tworząc otwór. Podaje się, że średni styczny wymiar światła naczynia wynosi minimum 100  $\mu\text{m}$ , a średnia długość elementu naczyniowego – do 800  $\mu\text{m}$  (Carlquist 1988). Włókna drzewne mogą być cienko- lub grubościennie i są nieprzegrodzone, a ich długość waha się w granicach 900-1600  $\mu\text{m}$ .

W drewnie jesionu miękisz systemu osiowego klasyfikowany jest jako przynaczyniowy oraz pozanaczyniowy, a ten w systemie radialnym, czyli którego komórki tworzą promienie drzewne jest zwykle wydłużony w kierunku promieniowym, co oznacza, że promienie są głównie jednako-komórkowe. Występuje w nich zwykle od 1 do 10 rzędów komórek, a na 1 mm drewna przypada od 4 do 12 promieni. Czasami występuje zróżnicowanie morfologiczne komórek systemu radialnego na komórki wydłużone osiowo i promieniowo, co daje podstawę sklasyfikowania promienia drzewnego jako różno-komórkowy.

Jesion wyniosły należy do rodziny oliwkowatych (*Oleaceae*), występuje w Europie, z wyłączeniem regionu śródziemnomorskiego, i umiarkowanym klimacie Azji (<https://insidewood.lib.ncsu.edu/>, 5.04.2023). Wytwarza jedynie formę drzewiastą. Jest gatunkiem twardzielowym o twardzieli zabarwionej na brązowo (a także na różne odcienie brązu), bądź na kolory od białego do szarego. Jego drewno ma średnią gęstość względną – 0,40-0,70  $\text{g}/\text{cm}^3$  i jest cenione w przemyśle drzewnym, zwłaszcza wykorzystywane jest do wyrobu parkietów, a także sprzętu sportowego czy przedmiotów codziennego użytku. Ponadto, gatunek ten wyróżnia się relatywnie późnym wiekiem, w którym formowana jest twardziel. Według danych literaturowych jesion formuje twardziel w wieku 60-70 lat (Bugala 1995).



Od początku lat 90-tych na całym obszarze zasięgu występowania tego gatunku obserwuje się proces chorobotwórczego zamierania jesionu. Podaje się, że jego głównym sprawcą jest nowo opisany grzyb *Chalara fraxinea* (Kowalski 2006), a za czynniki wtórnego oddziaływania uważa się obniżenie poziomu wód gruntowych, jako przejaw zmian klimatycznych, i późne przymrozki w okresie wiosennym. Zamieranie jesionu traktuje się zatem jako chorobę kompleksową. Z rejestru prowadzonego przez Lasy Państwowe wiadomo, że w 2005 r. w polskich lasach było 119 drzew matecznych, 175 źródeł nasion i 266 drzewostanów nasiennych (wyłączonych i gospodarczych) jesionu wyniosłego, a w 2019 już jedynie 25 drzew matecznych, 118 źródeł nasion i 74 drzewostany (<https://www.lbg.lasy.gov.pl/>, z dn. 22.04.2023r. W 2019 roku liczba drzew matecznych zmniejszyła się zatem o prawie 80% w porównaniu do stanu z roku 2005. Przedstawione dane przedstawiają ogromną skalę zjawiska zamierania jesionów. Najbardziej podatne na zamieranie okazały się być przede wszystkim młode drzewostany pochodzenia sztucznego (ale także naturalnego), zlokalizowane w centralnej i północno-wschodniej Polsce. W starszych drzewostanach oraz tych położonych w południowej Polsce obserwowano mniej uszkodzeń.

Zamieranie jesionów objawia się przebarwieniem liści, przerzedzeniem korony, nekrozami na pędach głównych i gałęziach oraz zamieraniem korzeni (Kowalski, Łukomska 2005). W kolejnych etapach choroby obserwuje się więdnienie liści, zamieranie pędów, gałęzi, całych drzew i drzewostanów (Stocki, Stocka 1999).



Ryc. 1. Drzewostan jesionowy w Nadleśnictwie Łochów, z dn. 01.07.2019. W centralnej części zdjęcia widoczne jesiony z symptomami zamierania (znaczna defoliacja aparatu asymilacyjnego).

Jako że w strukturze drewna zapisana jest historia zdarzeń środowiskowych, w literaturze znajdujemy prace opisujące modyfikacje struktury drewna jesionu w kontekście przewodnictwa hydraulicznego pni drzew charakteryzujących się różnym stopniem nasilenia zamierania (Tulik 2009), jednak anatomiczne podstawy tworzenia twardzieli u jesionów, jak dotąd nie zostały zbadane. Ze względu na znaczny udział komórek miękiszowych w drewnie jesionu, prowadzenie obserwacji ich zmian morfologicznych i anatomicznych daje możliwość opisanie modelu twardzielowania w drzewach o różnym statusie zdrowotnym.

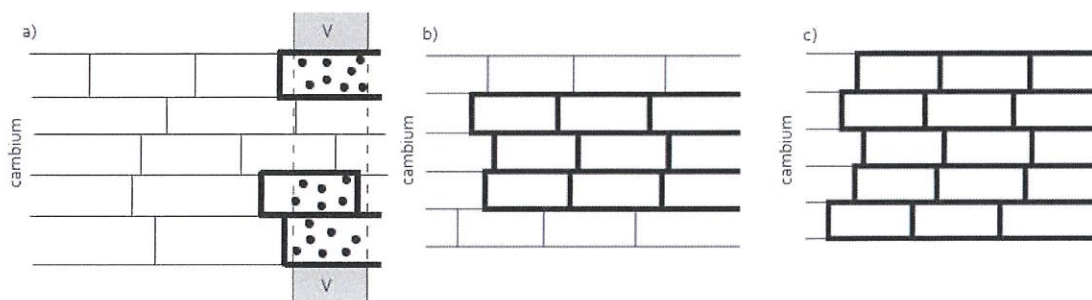
Postawiono zatem następującą hipotezę roboczą: *z uwagi na fakt, że proces tworzenia drewna jest regulowany czynnikami środowiskowymi i wewnątrz-organizmalnymi, twardzielowanie w pniu jesionu z widocznymi oznakami zamierania jest inicjowane wcześniej niż w pniu zdrowego jesionu.*

Do badań pozyskano krążki drewna z jesionów zdrowych i ze znacznym ubytkiem aparatu asymilacyjnego, które określono jako zamierające (Ryc. 1). Wiek jesionów wyrażony liczbą słoików rocznych wynosił średnio 90 lat. Krążki pozyskano z pnia z wysokości pierśnicy, które po przewiezieniu do laboratorium poddano skrawaniu. Pozyskano zarówno przekroje poprzeczne, jak i podłużne promieniowe. Weryfikacja hipotezy nastąpiła z wykorzystaniem metod identyfikacji jąder komórkowych i skrobi w komórkach miękiszowych przy użyciu barwnika cytochemicznego. Należy zaznaczyć, że w przypadku badań nad drewnem jesionu konieczne było dopracowanie metody barwienia, by odczynnik chemiczny penetrował ściany komórkowe elementów drewna. Jakościowe badania nad ścianami komórkowymi (celulozowe/zlignifikowane) przeprowadzono z użyciem barwnika cytochemicznego oraz wykorzystując autofluorescencję ligniny. Przeanalizowano łącznie 540 słoików rocznych, a w nich ponad 1600 promieni drzewnych. Analizowano również wszystkie komórki miękiszowe systemu osiowego, które zawierał pozyskany przekrój promieniowy przez drewno. W toku badań uzyskano następujące wyniki:

- a. na podstawie badań anatomicznych zidentyfikowano jedynie biel (strefa z żywymi komórkami miękiszowymi) oraz strefę przejściową (strefa, w której obserwowano początek obumierania komórek miękiszowych). Typowej twardzieli nie stwierdzono,
- b. zarówno u jesionów zdrowych, jak i z symptomami zamierania realizacja PCD w przypadku komórek miękiszowych obejmuje m. in. lignifikację ściany komórkowej i trawienie cytoplazmy, jednak procesy te są wyraźnie rozdzielone czasowo i przestrzennie. Lignifikacja ścian komórkowych następuje w bieżącym przyroście rocznym, a więc blisko kambium, natomiast śmierć komórek miękiszowych po kilkudziesięciu latach. Oznacza to, że informacja pozycyjna, rozumiana jako odległość od kambium, ma zasadnicze znaczenie w realizacji genetycznie zaprogramowanej śmierci komórek miękiszowych, co znajduje potwierdzenie w danych literaturowych,
- c. u jesionów z oznakami zamierania, obumieranie komórek miękiszowych rozpoczyna się w fizjologicznie młodszych słoikach rocznych,
- d. zarówno u jesionów zdrowych, jak i z symptomami zamierania długość życia większości obserwowanych komórek miękiszowych wynosi blisko 90 lat, co na podstawie danych literaturowych, daje podstawę do określenia ich jako długowieczne,
- e. u jesionów pojawienie się substancji twardzielowych w komórkach miękiszowych, przyczyniające się do zmiany zabarwienia drewna, nie jest skorelowane ze śmiercią tych komórek,

- f. jedynie badania na poziomie anatomicznym tkanki drzewnej dają możliwość identyfikacji typowej twardzieli stosownie do definicji IAWA.

Na podstawie otrzymanych wyników i w zestawieniu z rezultatami badań nad żywotnością komórek miękiszowych u innych gatunków drzew zaproponowano schemat zmian morfoanatomicznych komórek miękiszowych towarzyszących twardzielowaniu (Ryc. 2).



Ryc. 2. Schematy lignifikacji ścian komórek miększu promieniowego (widok przekroju promieniowego), w bieżącym przyroście rocznym oraz dane dot. długości życia komórek miękiszowych. Pogrubiona linia oznacza zlignifikowaną ścianę komórkową komórek miękiszowych, V – człon naczyniowy, przerywana linia – ściana naczynia, wypełnione kółka - jamki półproste, cambium–cambium.

- miękkisz promieniowy w bieżącym przyroście rocznym u *Populus sieboldii* x *P. grandidentata*. Długość życia komórek max. 5 lat (na podst. Nakaba i in. 2012)
- miękkisz promieniowy w bieżącym przyroście rocznym u *Abies sachalinensis*. Długość życia komórek max. 10 lat (na podst. Nakaba i in. 2006)
- miękkisz promieniowy w bieżącym przyroście rocznym u *Fraxinus excelsior*. Długość życia komórek liczona w dziesiątkach lat.

Uzyskane wyniki badań pozwalają przyjąć hipotezę roboczą i postawić tezę, że stan zdrowotny drzew ma wpływ na inicjację twardzielowania. Jesion wyniosły wydaje się być jednym z nielicznych przedstawicieli drzewiastych z długo żyjącym protoplastem komórek miękiszowych o zlignifikowanych ścianach komórkowych. Wnioskuje się, że lignifikacja ściany komórek miękiszowych już w bieżącym słoju rocznym przyczynia się do zwiększenia wytrzymałości drewna, a aktywne metabolicznie komórki miękiszowe stanowią rezerwuar energetyczny, również w starszych słojach rocznych drewna. Kondycja zdrowotna drzew kształtowana m.in. oddziaływaniem mikroorganizmów, zmianami klimatycznymi, w tym długotrwałymi suszami, czy obniżeniem poziomu wody gruntowej, wpływa na uruchomienie mechanizmów obronnych obserwowanych na poziomie tkanki drzewnej. Wyniki

omawianych badań niewątpliwie wypełniają braki literaturowe dotyczące biologii jesionu i reakcji drzew na niekorzystne warunki zewnętrzne.

## 5. Perspektywy dalszych badań

Uzyskane wyniki obserwacji anatomicznych dotyczące formowania się twardej tkanki u drzew leśnych, które charakteryzuje odmienny scenariusz realizacji programu rozwojowego przez komórki miękiszowe, wskazują na potrzebę dalszych badań w tym obszarze. Mając na uwadze wyniki badań nad długością życia komórek miękiszu drzewnego u robinii akacjowej, która wynosi zaledwie kilka lat, odpowiednim kierunkiem badań wydaje się być porównanie tej cechy u innych gatunków drzew z drewnem pierścieniowo-naczyniowym, a następnie porównanie z drewnem rozpięchło-naczyniowych gatunków. Warty również badań byłby proces formowania twardej tkanki u wiązków dotkniętych holenderską chorobą związaną z okluzjami światła naczyń przez wcistki i substancje gumowe. Kontynuacja przedstawionych badań może być też ukierunkowana na poznanie molekularnych mechanizmów formowania się twardej tkanki u drzew leśnych. Optymistycznym dla osiągnięcia tej wiedzy jest niewątpliwie zsekwencjonowanie pierwszego genomu drzewa *Populus trichocarpa*, które posiada ponad 45 mln par zasad (~500 Mb,  $2n=38$ , Tuskan i in. 2006). Wiedza w tym zakresie przyczyniłaby się do lepszego zrozumienia kondycji zdrowotnej drzew i lasów w naturalnych i zarządzanych ekosystemach leśnych przy jednoczesnym prowadzeniu zrównoważonej gospodarki leśnej.

## 6. Spis literatury

- Arisandi R., Marsoem S. N., Sutapa J.P.G., Lukmandaru G. 2023.** The methods for measuring the area of heartwood and sapwood. *Reviews in Agricultural Science*, 11: 76-92. DOI: 10.7831/ras.11.0\_76.
- Bamber R. K. 1976.** Heartwood, its function and formation. *Wood Science and Technology*, 10: 1–8.
- Beritognolo I., Magel E., Abdel-Latif A., Charpentier J.P., Jay-Allemand C., Breton C. 2002.** Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiology*, 22: 291-300. DOI: 10.1093/treephys/22.5.291.
- Bugała W. 1995.** Jesionwyniosły *Fraxinus excelsior* L. Nasze drzewa leśne. Monografie popularnonaukowe, Poznań–Kórnik.
- Carlquist S. 1988.** Comparative Wood Anatomy. Springer Series in Wood Science. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Climent J., Gil L., Pardos J. 1993.** Heartwood and sapwood development and its relationship to growth and environment in *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC. *Forest Ecology and Management*, 59: 165–174.
- Hillis W. E. 1987.** Heartwood and tree exudates. Springer, New York.
- Jakubowski M., Kałuziński D., Tomczak A., Jelonek T. 2015.** Proportion of heartwood and sapwood in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stems grown in different site conditions. *Annals of Warsaw University of Life Sciences– SGGW, Forestry and Wood Technology*, 92: 122–126.
- Jakubowski M., Koszewski W. 2004.** Proportion of sapwood and heartwood in stems of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in mountain sites conditions. *Annals of Warsaw Agricultural University, Forestry and Wood Technology*, 55: 259–262.
- Kampe A., Magel E. 2013.** New insights into heartwood and heartwood formation. W: Fromm J. [red.]. Cellular aspects of wood formation. *Plant Cell Monographs* 20. Springer, Berlin–Heidelberg.
- Kokociński W. 2005.** Anatomia drewna. Prodruk, Poznań.
- Kowalski T. 2006.** Chalara fraxinea sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* 36: 264–270. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Kowalski T., Łukomska A. 2005.** Badania nad zamieraniem jesionu (*Fraxinus excelsior* L.) w drzewostanach Nadleśnictwa Włoszczowa. *Acta Agrobotanica*, 58 (2): 429–440.

- Kuriyama H., Fukuda H. 2002.** Developmental programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 568-573. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00305-9.
- Magel E., Jay-Allemand C., Ziegler H. 1994.** Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees*, 8: 165–171. DOI: 10.1007/BF00196843.
- Magel E. 2000.** Biochemistry and physiology of heartwood formation. W: Savidge R., Barnett J., Napier R. [red.]. *Molecular and cell biology of wood formation*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Minina E.A., Smertenko A.P., Bozhkov P.V. 2014.** Vacuolar cell death in plants: Metacaspase releases the brakes on autophagy. *Autophagy*, 10: 928-9. DOI: 10.4161/auto.28236.
- Morris H. R. 2016.** The structure and function of ray and axial parenchyma in woody seed plants. Praca doktorska. Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Ulm.
- Multilingual glossary of terms used in wood anatomy 1964.** IAWA, Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia, Winterthur.
- Nagai, S., Yazaki, K. & Utsumi, Y. 2022.** Heartwood formation progresses basipetally over years or decades in each conically shaped annual growth layer of *Cryptomeria japonica* stems. *Trees*, 36: 1853–1863. DOI: 10.1007/s00468-022-02333-w.
- Nakaba S., Sano Y., Kubo T., Funada R. 2006.** The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Reports*, 25: 1143–1148. DOI: 10.1007/s00299-006-0194-6.
- Nakaba S., Begum S., Yamagishi Y., Jin H., Kubo T., Funada R. 2012.** Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*. *Trees*, 26: 743–750.
- Nobuchi T., Sato T., Iwata R., Harada H. 1984.** Season of heartwood formation and the related cytological structure of ray parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia*. *Mokuzai Gakkaishi*, 30: 636–638.
- Pfanz H., Aschan G., Langenfeld-Heyser R., Wittmann C., Loose M. 2002.** Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis *Naturwissenschaften*, 89: 147–162. DOI: 10.1007/s00114-002-0309-z G.
- Ren S., Wang Z., Yan L., Feng Q., Chen Z., Zhao R. 2023.** Comparison of anatomical characteristics and chemical compositions between sapwood and heartwood of *Michelia macclurei*. *Industrial Crops and Products*, 193: 116190. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.116190.

- Smith R.A., Schuetz M., Roach M., Shawn D. Mansfield S. D., Ellis B., Samuels L. 2013.** Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell*, 25: 3988–3999. DOI: 10.1105/tpc.113.117176.
- Song K., Liu B., Jiang X., Yin Y. 2011.** Cellular Changes of Tracheids and Ray Parenchyma Cells from Cambium to Heartwood in *Cunninghamia Lanceolata*. *Journal of Tropical Forest Science*, 23, 478-487.
- Spicer R., Holbrook N.M. 2007.** Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: Does metabolic activity decline with cell age? *Plant, Cell and Environment*, 30: 934–943. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01677.x
- Stocki J., Stocka T. 1999.** Przyczyny zamierania drzew i drzewostanów jesionowych. *Bibl. Leśn.* Nr 118, Wyd. Świat, Warszawa. Szwalkiewicz J. Zamieranie drzew i drzewostanów jesionowych – przyczyny, skutki, prognoza. *Postępy Techniki w Leśnictwie*, 69: 24–30.
- Tulik M. 2009.** Struktura drewna jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) a proces zamierania drzewostanów jesionowych. *Sylvan*, 153: 662–667.
- Tulik M., Myśkow E. 2015.** Rola śmierci komórek drewna w sukcesie ewolucyjnym roślin drzewiastych. *Sylvan*, 159: 392–402. DOI: 10.26202/sylvan.2014119.
- Tulik M., Yaman B., Köse N. 2018.** Comparative tree-ring anatomy of *Fraxinus excelsior* with *Chalara dieback*. *Journal of Forestry Research*, 29: 1741–1749 DOI: 10.1007/s11676-017-0586-1.
- Tulik M., Jura-Morawiec J., Bieniasz A., Marciszewska K. 2019.** How long do wood parenchyma cells live in stem of Scot pine (*Pinus sylvestris* L.)? Studies on cell nuclei status along the radial and longitudinal stem axes. *Forests* 10: 977. DOI: 10.3390/f10110977.
- Tuskan G., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Rokhsar D. 2006.** The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313: 1596-604. DOI: 10.1126/science.1128691.
- Yin L., Jiang X., Ma L., Liu S., He T., Jiao L., Yin Y., Yao L., Guo J. 2022.** Anatomical adaptations of pits in two types of ray parenchyma cells in *Populus tomentosa* during the xylem differentiation. *Journal of Plant Physiology*, 278:153830. DOI: 10.1016/j.jplph.2022.153830.
- Zheng-Hua Y., Zhong R. 2015.** Molecular control of wood formation in trees. *Journal of Experimental Botany* 66: 4119–4131.



**Strony internetowe:**

<https://insidewood.lib.ncsu.edu/> z dn. 5.04.2023

[https://www.lbg.lasy.gov.pl/documents/20597836/5440693/G%C5%82os+Lasu+9.2019+stro  
ny-16-17.pdf/6fd5b580-c987-b918-aec8-8ea4383c16ab](https://www.lbg.lasy.gov.pl/documents/20597836/5440693/G%C5%82os+Lasu+9.2019+stro<br/>ny-16-17.pdf/6fd5b580-c987-b918-aec8-8ea4383c16ab) z dn. 5.04 .2023

## **7. Załączniki**

- 1) Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej.
- 2) Oświadczenia współautorów.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.

