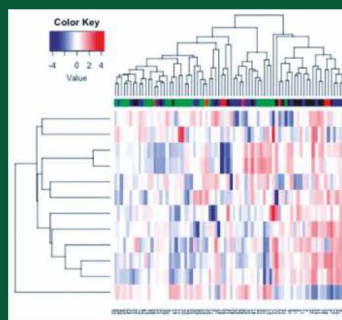
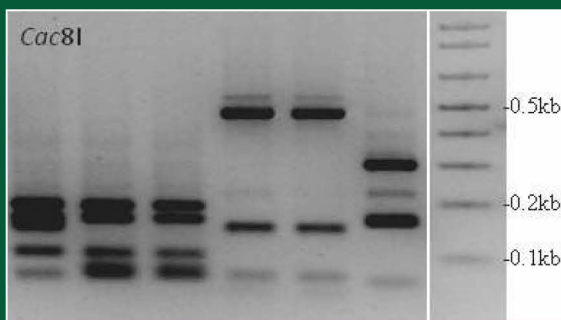
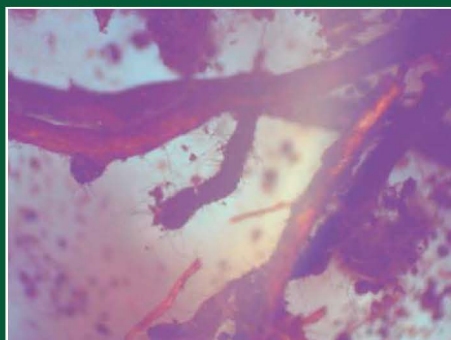


# Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu

Nowe wyzwania  
w badaniach botanicznych i środowiskowych

pod redakcją **Grażyny Łaskiej**



**Różnorodność biologiczna  
– od komórki do ekosystemu**

Nowe wyzwania w badaniach  
botanicznych i środowiskowych

**Biological diversity  
– from cell to ecosystem**

New challenges in botanical  
and environmental research





Polskie Towarzystwo Botaniczne  
Oddział w Białymstoku

Polish Botanical Society  
Branch in Białystok

**Różnorodność biologiczna  
– od komórki do ekosystemu**

Nowe wyzwania w badaniach botanicznych  
i środowiskowych

**Biological diversity  
– from cell to ecosystem**

New challenges in botanical  
and environmental research

pod redakcją/edited by  
**Grażyna Łaska**

Białystok 2018

Redakcja naukowa / Academic Editor

dr hab. **Grażyna Łaska**, prof. PB

Recenzenci / Reviewers

dr hab. **Andrzej Bajguz**, prof. UwB, dr hab. **Agnieszka Gniazdowska**, prof. SGGW,  
dr hab. **Katarzyna Jadwiszczak**, dr hab. **Grażyna Łaska**, prof. PB, prof. **Agnieszka Pietrosiuk**,  
dr hab. **Ewelina Ratajczak**, prof. **Elżbieta Romanowska**

Copyright © by: Redaktor naukowy / Academic Editor, Autorzy / Authors 2018

Publikacja jest wydawana na warunkach Licencji /  
The publication is issued under the terms of the License

Creative Commons Attribution 4.0 International  
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

e-ISBN 978-83-950171-5-5

p-ISBN 978-83-950171-6-2

Korekta językowa/Proofreading (English language correction):

**Maria Spychalska**

Projekt okładki / Cover design:

**Wydawca/Publisher**

Redaktor techniczny / Technical Editor:

**Andrzej Poskrobko**

Wydawca / Publisher:

**Polskie Towarzystwo Botaniczne**

Współwydawca / Co-Publisher:

**Agencja Wydawnicza EkoPress**

Polskie Towarzystwo Botaniczne / Polish Botanical Society

Al. Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa

<http://pbsociety.org.pl>

# Spis treści

## Przedmowa:

60 lat Białostockiego oddziału Polskiego Towarzystwa Botanicznego (1958-2018) ..... 7

## Preface:

60 years of the Białystok Branch of Polish Botanical Society (1958-2018) ..... 8

1. Grażyna **Łaska**, Katarzyna **Łogwiniuk**: Wskaźniki ekologiczne i waloryzacji w analizie statystycznej (Ecological and valorization indicators in statistical analysis) ..... 9
2. Alesia **Kruchonak**, Boris **Anoshenko**, Vladimir **Titok**: Assessment of environmental conditions for creating artificial model coenopopulations of rare and endangered plant species ..... 27
3. Grażyna **Łaska**, Aneta **Sienkiewicz**: Modelowanie matematyczne w badaniach środowiskowych (Mathematical modelling in environmental research) ..... 35
4. Emma **Arapetyan**: Cryopreservation of plant seeds of Western Ukraine natural and introduced flora. Comparative analysis of obtained data ..... 51
5. Katarzyna **Ciąćka**, Honorata **Kiljanek**, Paweł **Staszek**, Urszula **Krasuska**, Agnieszka **Gniazdowska**: Trochę chłodu dla wigoru – o przerywaniu spoczynku nasion w wyniku zabiegu stratyfikacji (A bit of coolness for vigor – about the breaking of seed dormancy by stratification) ..... 61
6. Sergey E. **Dromashko**: Use of molecular methods in assessing genetic diversity and biotechnological research ..... 75
7. Wioleta **Wasilewska-Dębowska**, Paweł **Rogowski**, Aleksandra **Urban**, Elżbieta **Romanowska**: Integracja metabolizmu węgla i azotu u roślin C4 (Integration of carbon and nitrogen metabolism in C4 plants) ..... 89
8. Magdalena **Chmur**, Andrzej **Bajguz**: Ekstrakcja i oczyszczanie brassinosteroidów z materiału roślinnego (Extraction and purification of brassinosteroids from plant material) ..... 105
9. Grażyna **Łaska**, Aneta **Szymajda**: The use of cow dung biomass for energy production ..... 117

10. Zofia **Tyszkiewicz**: Zmiany zachodzące w strukturach zbiorowisk grzybów *micromycetes* zasiedlających murszejącą glebę w dolinie rzeki Supraśl  
(The changes occurring in the structures of *micromycetes* fungi communities inhabiting the muck soil in the Supraśl river valley) ..... 131
11. Aleksander **Smoliga**, Konrad **Świtalski**: Flora naczyniowa opuszczonych osad leśnych Pojezierza Myśliborskiego (Vascular flora of abandoned forest settlement in the Myśliborskie Lakeland region [NW Poland]) ..... 143
12. Sergey **Dromashko**: System of teaching master's degree biologists at the Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus ..... 163

# 60 LAT

BIAŁOSTOCKIEGO ODDZIAŁU

POLSKIEGO TOWARZYSTWA BOTANICZNEGO (1958-2018)

## Przedmowa

Prezentowana monografia jest siódmą pozycją wydawniczą z cyklu „Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu” przedstawiającą prowadzone badania na różnych poziomach organizacji życia biologicznego.

Rok 2018 jest ważną datą dla Białostockiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Botanicznego (PTB) ze względu na 60-lecie jego powstania. Założycielem Oddziału PTB w Białymstoku w 1958 roku był ówczesny kierownik Katedry Biologii Akademii Medycznej w Białymstoku – Prof. dr hab. Witold Sławiński. Przez cały okres 60 lat, członkowie Białostockiego Oddziału – miłośnicy przyrody i ludzie pełni pasji do podejmowania działań w zakresie jej ochrony, aktywnie biorą udział w propagowaniu wiedzy botanicznej i kształtowaniu świadomości ekologicznej wśród społeczeństwa.

W tegorocznej, cyklicznej VII edycji wydawniczej, zwracamy szczególną uwagę na bioróżnorodność i jej znaczenie w badaniach botanicznych i środowiskowych w obszarze analiz statystycznych. Problematyka monografii poświęcona jest osiągnięciom z zakresu innowacyjnych metod i technik badawczych z uwzględnieniem różnorodnych analiz metodycznych i statystycznych. Na tej podstawie prezentujemy Państwu interpretację złożoności funkcjonowania przyrody w różnorodnych układach ekologicznych, uwzględniając oddziaływanie czynników biotycznych, abiotycznych i antropogenicznych środowiska przyrodniczego. Wielorakie metody i techniki badawcze, w tym analizy statystyczne stosowane w zakresie badań molekularnych, biotechnologicznych, biochemicznych, toksykologicznych, fizjologicznych, ekologicznych i środowiskowych prezentujemy na tle ochrony i funkcjonowania roślin i grzybów. Jest to doskonały przykład praktycznego podejścia do zagadnień ochrony przyrody oraz racjonalnego gospodarowania jej zasobami, jak również do oceny obecnego stanu zachowania badanego poziomu życia i określenia jego zagrożenia oraz podejmowania konkretnych działań na rzecz ochrony i monitorowania zachodzących zmian.

Prezentacja różnorodnych problemów i podejść do ich rozwiązania jest doskonałą platformą wymiany poglądów i doświadczeń oraz nawiązywania kontaktów w zakresie współpracy środowisk naukowych zainteresowanych tymi zagadnieniami.

Życząc Państwu miłej lektury, mam nadzieję, że monografia przyczyni się do kreatywnej dyskusji i kontynuacji badań w zakresie różnorodności biologicznej.

Grażyna Łaska



60 YEARS  
OF THE BIALYSTOK BRANCH  
OF POLISH BOTANICAL SOCIETY (1958-2018)

## Preface

This monograph is the 7<sup>th</sup> fascicle in the cycle on “Biological diversity – from the cell to the ecosystem” presenting results of research work at different levels of organization of biological life.

In 2018 the Białystok Branch of Polish Botanical Society (PBS) celebrates the 60<sup>th</sup> anniversary of foundation. It was founded in 1958 by the Head of the Chair of Biology at the Medical Academy in Białystok at that time, Prof. Dr hab. Witold Sławiński. Since that time the members of the Białystok Branch of PBS, the lovers of nature and the people passionately involved in all kinds of measures aimed at its protection, have been engaged in propagation of botanical knowledge and development of ecological awareness.

In this monograph particular attention is paid to the biodiversity and its significance in botanical and environmental studies in the aspect of statistical analyses. The main theme is presentation of achievements in the area of innovative methods and techniques, taking into account a variety of methodical and statistical analyses. The interpretation of complexity of the nature functioning in different ecological systems is presented paying attention to the effects of biotic, abiotic and anthropogenic factors. The research methods and techniques, including statistical analyses applied in molecular studies, biotechnology, biochemistry, toxicology, physiology, ecological and environmental studies are described against a background of protection and functioning of plants and fungi. The fascicle presents examples of practical approach to the problems of protection of the natural environment, rational management of its resources, evaluation of the present status of a given level of life, identification of its threats and to specific actions aimed at the environment protection and monitoring of its changes.

Presentation of a variety of problems and approaches to their solution is an excellent platform for exchange of ideas and experience as well as for making contacts to start cooperation of individuals or teams working towards similar goals.

Wishing you an interesting read, I do hope that the monograph will stimulate discussions on the problems presented and contribute to finding their solutions.

Grażyna Łaska

# 1 Wskaźniki ekologiczne i waloryzacji w analizie statystycznej

Grażyna Łaska<sup>1</sup> / Katarzyna Łogwiniuk<sup>2</sup>

1 Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska  
Katedra Inżynierii Rolno-Spożywczej i Kształtowania Środowiska  
ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok

2 Zespół Szkół Rolniczych  
Centrum Kształcenia Praktycznego w Białymstoku  
ul. ks. St. Suchowolca 26, 15-566 Białystok

e-mail: g.laska@pb.edu.pl

**Streszczenie:** Celem pracy jest analiza statystyczna wskaźników ekologicznych i waloryzacji określonych w dolinie rzeki Białej na terenie Białegostoku. Wskaźniki ekologiczne i walory przyrodnicze szaty roślinnej wybranych fragmentów doliny Białej oceniono z wykorzystaniem gatunków roślin naczyniowych. Do analiz statystycznych wykorzystano ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski Zarzyckiego i in. (2002), uwzględniając trzy wskaźniki siedliskowe (wilgotność gleby – W, trofizm – Tr i granulometryczny gleby – D). Walory przyrodnicze szaty roślinnej doliny rzeki Białej określono na podstawie wskaźników waloryzacji według Oświta (2000). W analizie statystycznej wykorzystano pakiet R version 3.4.4 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2012). Zależności pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami określono za pomocą współczynników korelacji r-Pearsona według klasyfikacji Guilford'a. Do prezentacji zmiennych GIS wykorzystano program QGIS ver. 2.18, za pomocą którego utworzono rastrowe mapy zróżnicowania przestrzennego badanych wskaźników ekologicznych i waloryzacji. Warstwę punktów badawczych opisano atrybutami średnich wartości wskaźników, a ich zmienność natężenia zaprezentowano za pomocą izolinii.

Na podstawie analiz statystycznych wskaźników ekologicznych i waloryzacji szaty roślinnej wybranych fragmentów doliny Białej stwierdzono, że przestrzenny rozkład zmienności badanych wskaźników wykazuje korelację i uporządkowanie punktów badawczych zgodnie z gradientem wilgotności gleby i granulometrycznym podłoża, co decyduje o wewnętrznym zróżnicowaniu badanych płatów roślinnych. Dokonana analiza statystyczna jest podstawą do wskazania zmiany sposobów użytkowania i kierunków ochrony cennych zasobów przyrody w dolinie rzeki Białej, w zmieniającym się środowisku miejskim.

**Słowa kluczowe:** liczby ekologiczne, waloryzacja przyrodnicza, interpolacja, rozkład przestrzenny wskaźników, QGIS

# 1 Ecological and valorization indicators in statistical analysis

Grażyna Łaska<sup>1</sup> / Katarzyna Łogwiniuk<sup>2</sup>

1 Białystok University of Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering  
Department of Agri-Food Engineering and Environmental Management  
45A, Wiejska Street, 15-351 Białystok

2 Agricultural Schools. Practical Training Center in Białystok  
26, Ks. St. Suchowolca Street, 15-566 Białystok

g.laska@pb.edu.pl

**Abstract:** The aim of the study was to perform statistical analysis of ecological and valorization indicators determined in the Biała River valley within the Białystok city. In the evaluation of ecological indicators and natural valor of the flora in the selected fragments of the Biała River valley, the plant species were included. Statistical analysis was performed with the use of ecological indicator values of the vascular plants of Poland, by Zarzycki et al. (2002) taking into account three habitat indices: soil moisture content (W), trophism (Tr) and granulometric soil index (D). The natural valors of the flora of the Biała River valley were evaluated on the basis of valorization indicator according to Oświt (2000). Statistical analysis was made using the package R version 3.4.4 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2012). The relations between the ecological and valorization indices and phytosociological releves were characterized by the r-Pearson correlation coefficients. The GIS variables presentation was made using the program QGIS ver. 2.18, permitting drawing raster maps of spatial differentiation of the studied ecological and valor indices. The layer of study sites was described by the attributes of the average values of the indices and the changes in intensity were marked by isolines.

Statistical analysis of the ecological and valor indices describing the flora in the area studied evidenced that the spatial distribution of variation of the indices analyzed shows correlation of the study sites and their ordering according to the increasing gradient of moisture content and granulometric soil of the habitats, which determines the internal differentiation of the vegetation patches. Results of the statistical analysis provide the grounds for indicating the changes in the mode of use and measures of protections of the valuable natural resources of the Biała River valley in the variable urban environment.

**Keywords:** ecological indicator values, valorization of natural resources, interpolation, spatial distribution of indices, QGIS

## 1. Wstęp

Antropopresja terenów dolinowych w miastach powoduje istotne zmiany stosunków wodnych i reżimu hydrologicznego w całej zlewni (Piórkowski 2002; Mahon, Miller 2003). Zbiorowiska roślinne w dolinach rzecznych zajmują wówczas niewielkie i izolowane powierzchnie oraz często, ze względu na różne sposoby ich użytkowania (koszenie, brak koszenia, nasypy, wykopy), są kształtowane w sposób nieprawidłowy w stosunku do warunków siedliskowych (Kozłowska 2005; Kryszak, Kryszak 2007; Grzelak i in. 2008; Kryszak i in. 2008; Collinge 2009; Gamrat i in. 2010). Przyczynia się to do wzrostu udziału gatunków obcych i spadku udziału gatunków autochtonicznych (rodzimych) oraz zmiany szaty roślinnej dolin rzecznych (Dembek i in. 2002; Pausas i in. 2003; Kryszak, Grynia 2005; Kryszak i in. 2006; Gamrat, Burczyk 2007). Szczególnie zmienione są śródmiejskie doliny rzeczne ze względu na regulację ich koryt rzecznych do pełnienia funkcji odbiorników wód opadowych lub odbiorników oczyszczonych ścieków (Ociepa i in. 2009, Łaska 2012). Koryto rzeki Białej na terenie Białegostoku jest również uregulowane, z widocznymi zmianami strefy brzegowej cieku i wylotami kanalizacji deszczowej (Tyszewski, Kardel 2009). Zanieczyszczenie wód cieku odpadami komunalnymi i przemysłowymi, zła struktura strefy korytowej, brzegowej, strefy terasów i zboczy oraz strefy przydolinowej wskazują obecnie na niskie walory przyrodniczo-krajobrazowe rzeki Białej (Tyszewski, Kardel 2009). Dlatego w zagospodarowaniu miejskich dolin rzecznych ważne jest właściwe kształtowanie stref buforowych wokół wód i remeandryzacja koryt rzek, które będą spełniały właściwe funkcje przyrodnicze i krajobrazowe śródmiejskiej strefy rzecznej (Haber 2001; Zachariasz 2006; Brunetta, Voghera 2008; Kostecka 2010).

Celem niniejszej pracy jest analiza statystyczna wskaźników ekologicznych i waloryzacji oceniona na podstawie składu gatunkowego roślin naczyniowych i kompozycji florystycznych w dolinie rzeki Białej na terenie Białegostoku. Określone w badaniach wskaźniki ekologiczne i waloryzacji szaty roślinnej rzeki Białej są podstawą do wskazania i przywrócenia klasycznych stref ekomorfologicznych cieku oraz określenia zaleceń do odtworzenia niegdyś funkcjonującej tutaj roślinności (Dembek 2002; Roo-Zieleńska i in. 2007; Ferrari i in. 2008; Solon i in. 2012; Łaska 2015).

## 2. Teren i obiekt badań

Badania doliny rzeki Białej prowadzono w północno-wschodniej Polsce, w centralnej części miasta Białegostoku. Jest to obszar o powierzchni 16,28 ha, związany z formą geomorfologiczną pochodzenia rzecznoego, którą reprezentują tarasy zalewowe, dna dolin i rozlewisk. W północno-zachodniej części badanego obszaru, dno doliny rzeki Białej wypełniają holocenijskie drobnoziarniste piaski humusowe i namuły den dolinnych. W południowo-wschodniej części występuje równina akumulacji biogenicznej wypełniona czwartorzędowymi utworami torfowymi (Kwiatkowski, Gajko 2011).

Biała jest rzeką IV rzędu, lewostronnym dopływem Supraśli. Całkowita powierzchnia zlewni Białej wynosi 133,37 km<sup>2</sup>, z tego 83 km<sup>2</sup> (62%) znajduje się na terenie Białegostoku (Tyszewski, Kardel 2009). Całkowita długość rzeki Białej wynosi 32,7 km, w tym 27,3 km przepływa w granicach miasta. Jej zlewnię prawostronną na terenie Białegostoku stanowi zlewnia Dolistówki o powierzchni 12,9 km<sup>2</sup>, a lewostronną – zlewnia Bażantarki o powierzchni 11,20 km<sup>2</sup> (Kwiatkowski, Gajko 2011). Zlewnia rzeki Białej jest prawie bezleśna, a dominującymi formami użytkowania na jej terenie są obszary zabudowane (29%), grunty orne (20%) oraz łąki i pastwiska (9%). Ze względu na różnorodne zagospodarowanie zlewni, poszczególne jej odcinki pełnią różne funkcje. Część górna doliny rzeki Białej ma charakter rolniczy, część środkowa, związana w największym stopniu z aglomeracją miejską, ma charakter zlewni zurbanizowanej, a część dolna doliny – jest odbiornikiem oczyszczonych wód z oczyszczalni (Tyszewski, Kardel 2009).

## 3. Materiały i metody

W metodach badań wykorzystano terenowe badania kartograficzne, fitosocjologiczne i siedliskowe zbiorowisk roślinnych, techniki GIS oraz system globalnego pozycjonowania GPS. Badania terenowe prowadzono w latach 2010-2012, a w latach 2012-2016 monitorowano przemiany szaty roślinnej w dolinie rzeki Białej z uwzględnieniem różnorodnych sposobów użytkowania roślinności w tym okresie. W badaniach terenowych wykonano 104 zdjęcia fitosocjologiczne z wykorzystaniem 6-stopniowej skali ilościowości Braun-Blanqueta. Wszystkie zdjęcia fitosocjologiczne zbiorowisk roślinnych opracowano w postaci analitycznych 11 tabel zbiorowisk. W tabelach, przynależność gatunków do poszczególnych jednostek roślinności ustalono za W. Matuszkiewiczem (2008). Nazwy gatunków roślin

naczyniowych przyjęto za Mirkiem i in. (2002), a nazwy mszaków za Ochyra i in. (2003). Do kodowania siedlisk przyrodniczych oraz gatunków roślin i zwierząt zamieszczonych w Załącznikach I i II Dyrektywy Siedliskowej zastosowano ujęcie zgodne z „Poradnikiem ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – poradnik metodyczny” (Herbich 2004). System GPS wykorzystano do określenia pozycji punktów badawczych w terenie.

Oceny warunków środowiskowych w dolinie rzeki Białej dokonano na podstawie ekologicznych liczb wskaźnikowych Zarzyckiego i in. (2002) z wykorzystaniem trzech wskaźników siedliskowych: wilgotność gleby – W, trofizm – Tr i granulometryczny gleby – D. Walory przyrodnicze szaty roślinnej doliny rzeki Białej określono na podstawie wskaźników waloryzacji mokradeł i siedlisk hydrogenicznych według Oświta (2000). Średnie wartości poszczególnych wskaźników ekologicznych i waloryzacji obliczono dla każdego ze 104 punktów badawczych.

Oprogramowanie GIS (QGIS ver. 2.18) wykorzystano do utworzenia rastrowych map tematycznych zróżnicowania przestrzennego badanych wskaźników ekologicznych i waloryzacji w dolinie rzeki Białej. W tym celu warstwę punktów badawczych opisano atrybutami średnich wartości analizowanych wskaźników, a ich zmienność natężenia zaprezentowano za pomocą izolinii.

Pakiet statystyczny R ver. 3.4.4 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2012) wykorzystano do obliczeń procentowego udziału (frekwencji) badanych wskaźników. Zależności pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami oraz wskaźnikami i zdjęciami fitosocjologicznych z listami gatunków roślin naczyniowych określono za pomocą współczynników korelacji r-Pearsona. Przyjęto klasyfikację Guilford'a, gdzie:  $|r| = 0$  – brak korelacji;  $0,0 < |r| \leq 0,1$  – korelacja nikła;  $0,1 < |r| \leq 0,3$  – korelacja słaba;  $0,3 < |r| \leq 0,5$  – korelacja przeciętna;  $0,5 < |r| \leq 0,7$  – korelacja wysoka;  $0,7 < |r| \leq 0,9$  – korelacja bardzo wysoka;  $0,9 < |r| < 1,0$  – korelacja niemal pełna;  $|r| = 1$  – korelacja pełna. Za istotne statystycznie przyjęto wartości spełniające warunek, że  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki i dyskusja

W zróżnicowaniu florystycznym doliny rzeki Białej stwierdzono łącznie 11 zbiorowisk roślinnych, reprezentujących 5 klas fitosocjologicznych. Wśród nich odnotowano 2 typy zbiorowisk leśnych (nadrzeczny łęg wierzbowy *Salicetum albo-fragilis* R.Tx. 1955 – kod 91E0-1 i nadrzeczny łęg topolowy *Populetum albae* Br.-Bl. 1931 – kod 91E0-2) wymienione w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG, oraz

9 typów zbiorowisk nieleśnych niezwiązanych z siedliskami przyrodniczymi o znaczeniu wspólnotowym (Łaska 2012).

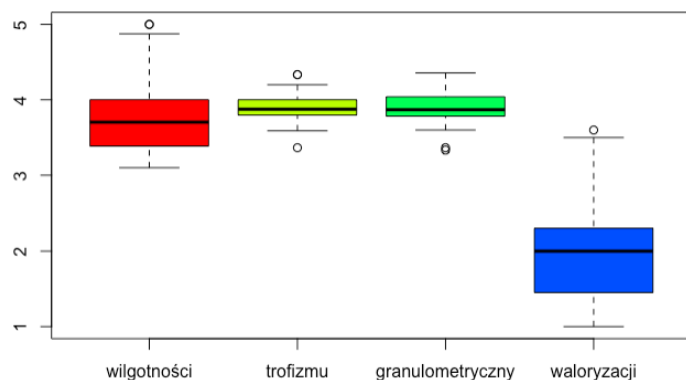
W badaniach stwierdzono, że dolina rzeki Białej ma charakter łąkowy, a zbiorowiska roślinne, które obecnie w tym miejscu występują, to przede wszystkim wysokie szuwały trawiaste, szuwały trzcinowe i turzycowe lub kośne łąki wilgotne, ziołorośla połąkowe i nitrofilne ziołorośla okrajkowe, kształtujące się w otoczeniu nadrzecznych łągów wierzbowych. Pozostałe typy zbiorowisk reprezentują roślinność wtórną, ruderalną lub półruderalną, towarzyszącą człowiekowi w zurbanizowanej strefie miejskiej.

Obecny skład zbiorowisk roślinnych w dolinie rzeki Białej wykazuje zróżnicowanie w zależności od wilgotności i składu granulometrycznego podłoża oraz trofizmu siedlisk. Wskazują na to analizy statystyczne badanych wskaźników ekologicznych i waloryzacji.

#### 4.1. Analiza wskaźników ekologicznych

##### 4.1.1. Wskaźnik wilgotności gleby (W)

Na badanym terenie doliny rzeki Białej, średni wskaźnik wilgotności gleby (W), określony dla 104 punktów badawczych, na podstawie gatunków budujących skład florystyczny zbiorowisk roślinnych, wskazuje na obecność siedlisk wilgotnych ( $3,59 \pm 0,79$ ). W dolinie rzeki Białej kształtuje się on w granicach od 3,1 (siedliska świeże) do 5,0 (siedliska mokre) i charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem płatów roślinnych (współczynnik zmienności  $V = 22,02\%$ ) (Ryc. 1).

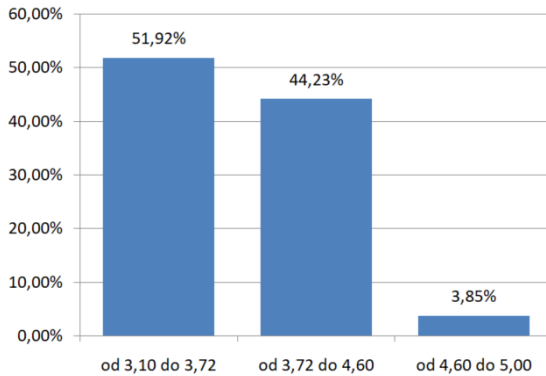


**Rycina 1.** Zróżnicowanie średnich wartości wskaźników ekologicznych i waloryzacji w dolinie rzeki Białej

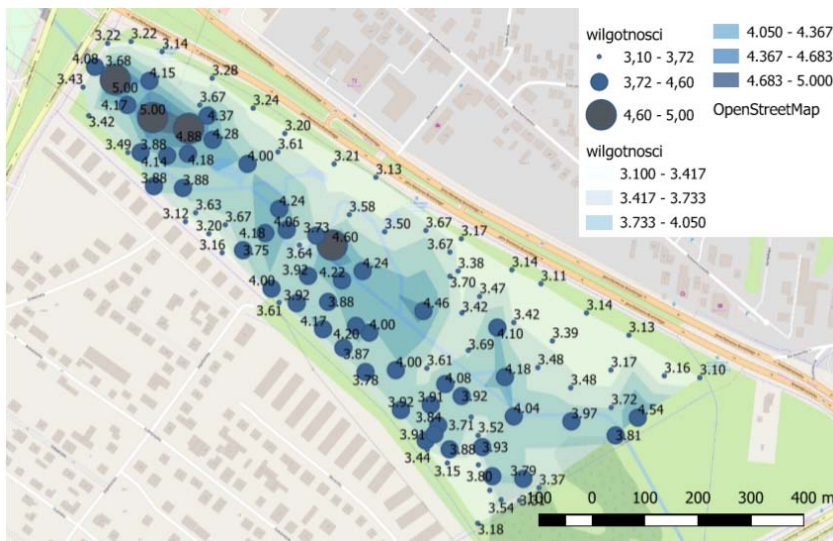
**Figure 1.** Differentiation of average values of ecological indicators and valorization in the Biała river valley

W badaniach stwierdzono, że zbiorowiska roślinne najczęściej preferują siedliska świeże i średnio wilgotne, o wartości średniej wilgotności od 3,10 do 3,72 (52%) (Ryc. 2a). Największe średnie wartości wskaźnika wilgotności gleby (W) w przedziale 4,6-5,0 (3,9%) wykazano dla szuwarów typowych *Phragmitetum australis* (Gams 1927) Shmale 1939, w bezpośrednim sąsiedztwie uregulowanego koryta rzeki Białej (Ryc. 2b).

a)



b)



**Rycina 2.** Zróżnicowanie średnich wartości wskaźnika wilgotności gleby (a) i ich przestrzennego rozmieszczenia w dolinie rzeki Białej (b)

**Figure 2.** Differentiation of mean values of soil moisture index (a) and their spatial distribution Biala river valley (b)

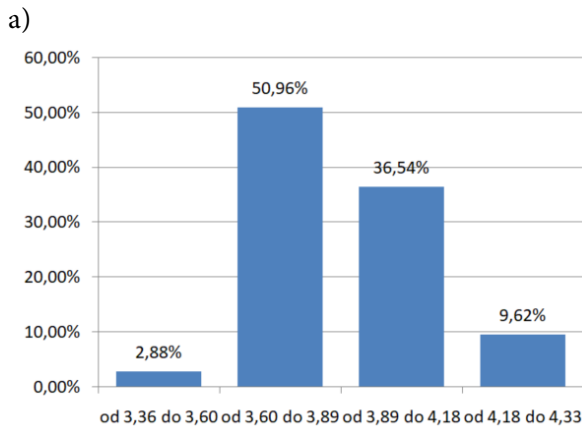


Wśród gatunków roślin składu florystycznego badanych zbiorowisk, największą wartość (5,5–6) stwierdzono dla *Glyceria maxima* (Hartm.) Holmb., *Glyceria fluitans* (L.) R. Br., *Typha latifolia* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Rorippa amphibia* (L.) Besser, *Veronica beccabunga* L., *Acorus calamus* L., *Carex acutiformis* Ehrh., *Carex gracilis* Curtis, *Carex pseudocyperus* L., *Carex vesicaria* L. Najmniejsze średnie wartości wskaźnika wilgotności (2,79–2,85) określono dla zbiorowisk ruderalnych klasy *Artemisitea* – zespołu *Echio-Melilotetum* R.Tx. 1947 zlokalizowanego na piaszczystym nasypie w północno-zachodniej części badanego terenu (Ryc. 2b).

#### 4.1.2. Wskaźnik trofizmu (tr)

Obliczone dla 104 punktów badawczych średnie wartości wskaźnika trofizmu wykazują mniejsze zróżnicowanie płatów roślinnych (współczynnik zmienności  $V = 13,81\%$ ) (Ryc. 1). Średnia wartość wskaźnika trofizmu osiąga  $3,80 \pm 0,53$  i reprezentuje siedliska zasobne, eutroficzne. Najżyźniejsze siedliska o troficzności od 4,18 do 4,33 są nieliczne (9,62%) (Ryc. 3a); reprezentuje je głównie nadrzeczny łęg wierzbowy *Salicetum albo-fragilis* R.Tx. 1955, zlokalizowany w środkowo-wschodniej części doliny rzeki Białej (Ryc. 3b). Gatunki roślin naczyniowych, osiągające najwyższe wartości wskaźnika trofizmu (5) w tych płatach roślinnych, to: *Ficaria verna* Huds., *Chelidonium majus* L., *Humulus lupulus* L., *Galium aparine* L., *Urtica dioica* L. i *Sambucus nigra* L.

Na badanym terenie doliny rzeki Białej zbiorowiska roślinne najczęściej preferują siedliska średnio troficzne, mezotroficzne (50,95%) o wartości wskaźnika trofizmu w granicach od 3,60 do 3,89 (Ryc. 3a). Wykształciły się na nich ziołorośla połąkowe *Lythro-Filipenduletum ulmariae* Hadač et all. 1997 z *Urtica dioica* i wilgotne łąki wyczyńcowe *Alopecuretum pratensis* (Regel 1925) Steffen 1931 oraz półruderalne zbiorowiska zdominowane przez perz – zespół *Convolvulo arvensis-Agropyretum repentis* Felföldy 1943 (Ryc. 3b).



**Rycina 3.** Zróżnicowanie średnich wartości wskaźnika trofizmu (a) i ich przestrzennego rozmieszczenia w dolinie rzeki Białej (b)

**Figure 3.** Differentiation of mean values of trophism index (a) and their spatial distribution Biała river valley (b)

Zbiorowiska roślinne związane z gruntami hydrogenicznymi – szuwały trzcinowe *Phragmitetum australis* i szuwały mozgowe *Phalaridetum arundinaceae* (Koch 1926 n.n.) Libb. 1931 oraz zbiorowiska welonowe nad brzegami zbiorników wodnych na trwale wilgotnych lub mokrych miejscach – zespół *Urtico-Calystegietum sepium* Görs et Th. Müller 1969, charakteryzują się siedliskami zasobnymi i eutroficznymi, w granicach średnich wartości wskaźnika trofizmu od 3,89 do 4,18

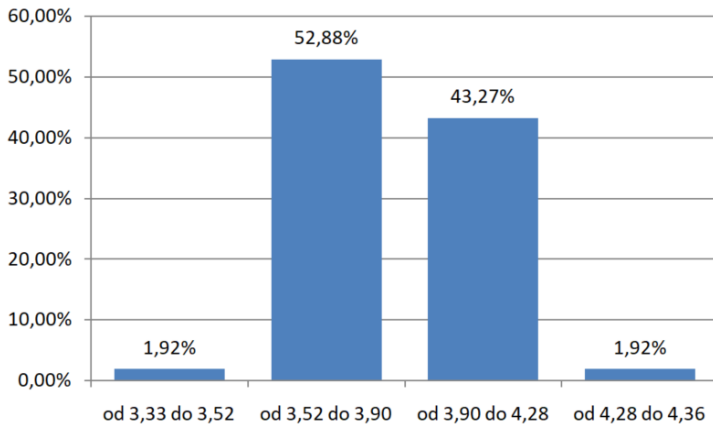
(36,54%) (Ryc. 3a). Lokują się one od środkowej części koryta rzeki w kierunku zachodnim zbocza doliny rzecznej (Ryc. 3b). Wartości minimalne wskaźnika trofizmu (3,36–3,60) (2,88%) stwierdzono dla zbiorowisk ruderalnych *Echio-Melilotetum* występujących na nasypach piaszczystych, w północno-zachodniej części badanego terenu (Ryc. 3b).

#### 4.1.3. Wskaźnik granulometryczny gleby (D)

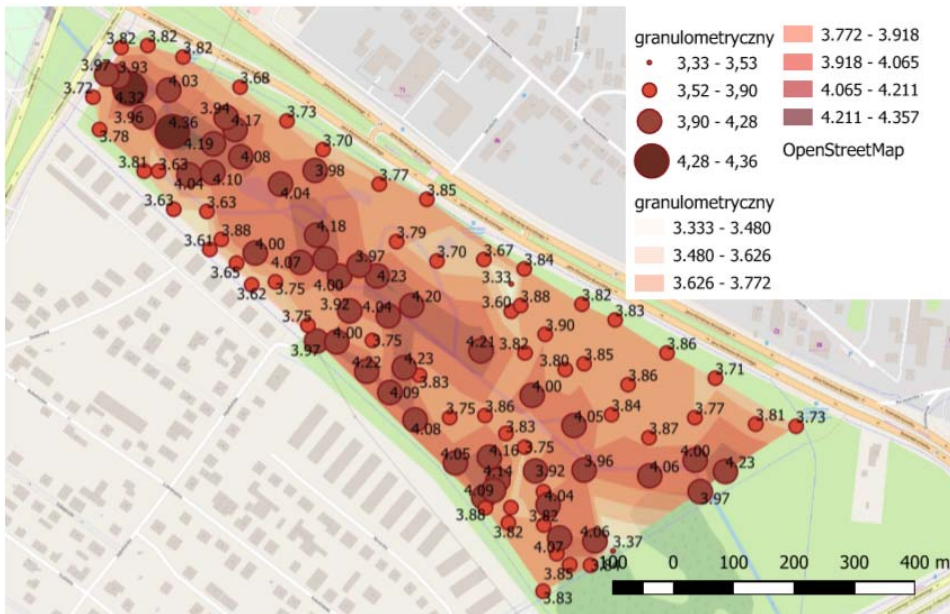
Średnia wartość wskaźnika granulometrycznego gleby (D) na badanym terenie osiąga wartość odpowiadającą glinom piaszczystym i utworom pylastym ( $D = 3,9 \pm 0,49$ ), i jest zróżnicowana w zakresie od 3,33 do 4,36 (współczynnik zmienności  $V=12,54\%$ ) (Ryc. 1). Glinom piaszczystym i utworom pylastym odpowiadają największe średnie wartości wskaźnika granulometrycznego gleby w przedziałach od 3,90 do 4,28 (43,27%) i od 4,28 do 4,36 (1,92%) (Ryc. 4a). Zasiedlają je głównie zbiorowiska szuwarów wysokich, trzcinowych *Phragmitetum australis* i mozgowych *Phalaridetum arundinaceae*, zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie koryta rzecznej, oraz zbiorowiska szuwarów turzycowych z turzycą błotną – zespół *Caricetum acutiformis* Sauer 1937 i ziołorośla połąkowe *Lythro-Filipenduletum ulmariae* występujące w zagłębieniach od strony południo-zachodniej (Ryc. 4b). Na badanym terenie, wśród gatunków roślin naczyniowych preferujących gliny piaszczyste i utwory pylaste, występujące z największymi wskaźnikami granulometrycznymi gleby, stwierdzono *Carex acutiformis* i *Carex gracilis* ( $D = 5$ ) oraz *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Glyceria fluitans*, *Glyceria maxima*, *Iris pseudoacorus* L., *Lysimachia vulgaris* L., *Lythrum salicaria* L. i *Polygonum bistorta* L. ( $D = 4,5$ ).

Wartości wskaźnika granulometrycznego gleby, kształtujące się w niskich przedziałach wartości od 3,33 do 3,52 (1,92%) i od 3,52 do 3,90 (52,9%), wskazują na obecność utworów piaszczystych w podłożu (Ryc. 4a). Są one zlokalizowane na krawędziach zboczy doliny rzecznej. Piaszczyste podłoże preferują zbiorowiska ruderalne *Echio-Melilotetum* w północno-zachodniej części terenu, zbiorowiska półruderalne *Convolvulo arvensis-Agrophyretum repentis* i łąki wyczyńcowe *Alopecuretum pratensis* na nasypie od strony południo-wschodniej oraz na piaszczystej skarpie od strony południowej – zbiorowiska bylin na okrajkach lasów wilgotnych *Urtico-Aegopodietum podagrariae* (R.Tx. 1963 n.n.) em. Dierschke 1974 i szczątkowa forma zniekształconego łęgu topolowego *Populetum albae* Br.-Bl. 1931 (Ryc. 4b). Wśród gatunków roślin naczyniowych, preferujących piaszczyste podłoża, charakteryzują się taksony: *Echium vulgare* L. i *Oenothera biennis* L. ( $D = 2,5$ ) oraz *Agrostis stolonifera* L., *Bunias orientalis* L., *Euphorbia cyparissias* L., *Heracleum sphondylium* L. i *Medicago lupulina* L. ( $D = 3$ ).

a)



b)



**Rycina 4.** Zróźnicowanie średnich wartości wskaźnika granulometrycznego gleby (a) i ich przestrzennego rozmieszczenia w dolinie rzeki Białej (b)

**Figure 4.** Differentiation of mean values of granulometric soil index (a) and their spatial distribution Biała river valley (b)

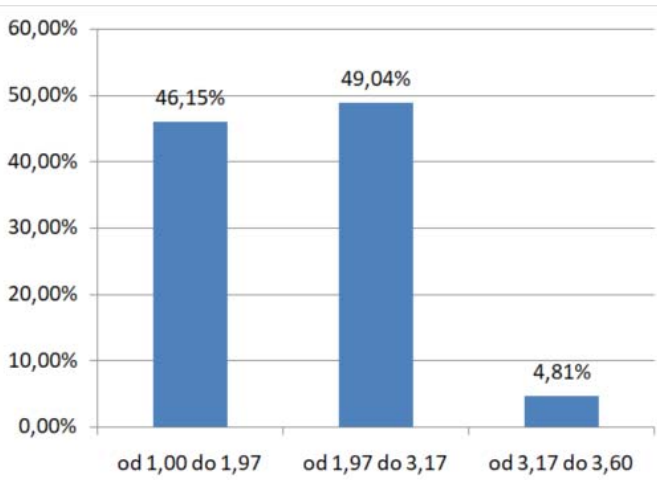
## 4.2. Analiza wskaźników waloryzacji

Na badanym terenie doliny rzeki Białej, średni wskaźnik waloryzacji mokradł i siedlisk hydrogenicznych, określony dla 104 punktów badawczych, na podstawie gatunków budujących skład florystyczny zbiorowisk roślinnych, wskazuje na obecność siedlisk o średnio małych walorach przyrodniczych (1,76). W dolinie rzeki Białej kształtuje się on w granicach od 1,0 (46,2%) – dla siedlisk o bardzo małych walorach przyrodniczych do 3,6 (4,8%) – dla siedlisk o dużych walorach przyrodniczych (Ryc. 1).

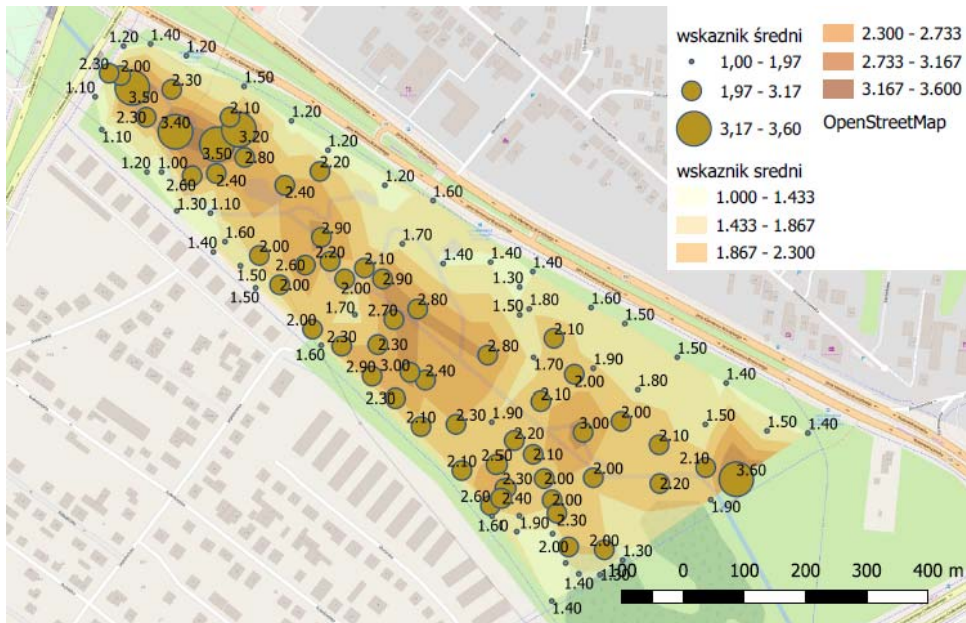
W dolinie rzeki Białej największą średnią wartość wskaźnika waloryzacji (2,8) i średnio umiarkowane walory przyrodnicze (klasa V) osiąga tylko jedno zbiorowisko – szuwarów trzcinowych *Phragmitetum australis* w bezpośrednim sąsiedztwie koryta rzecznej (Ryc. 5a, b). Umiarkowane walory przyrodnicze (klasa IV) stwierdzono dla płatów ziołorośli połąkowych *Lythro-Filipenduletum ulmariae* (średni wskaźnik waloryzacji 2,3), występujących w zagłębieniach od strony południowo-zachodniej. Dwa zbiorowiska reprezentują grupę o małych (2,0-2,2) walorach przyrodniczych (klasa III). Są to szuwały mozgowe *Phalaridetum arundinaceae* w bezpośrednim sąsiedztwie koryta rzecznej i szuwały turzycowe *Caricetum acutiformis* występujące w obniżeniu od strony południowo-zachodniej (Ryc. 5b). Średnio małymi (1,5-1,8) walorami przyrodniczymi (klasa II) cechuje się łąg wierzbowy z *Salix fragilis* zlokalizowany w środkowo wschodniej części doliny Białej oraz wilgotne łąki wyczyńcowe *Alopecuretum pratensis* występujące od strony południowo-wschodniej, a także nitrofilne zbiorowiska *Urtico-Calystegietum sepium* lokujące się od środkowej części koryta rzeki w kierunku zachodnim zbocza doliny rzecznej (Ryc. 5b).

Bardzo małe (1,2–1,4) walory przyrodnicze (klasa I) reprezentuje szczątkowa postać łągu topolowego *Populetum albae* i nitrofilne zbiorowiska bylin *Urtico-Aegopodietum podagrariae* występującego na piaszczystej skarpie od strony południowej oraz półruderalne zbiorowiska *Convolvulo arvensis-Agropyretum repentis* znajdujące się na nasypie od strony południowo-wschodniej i zbiorowiska ruderalne *Echio-Melilotetum* w północno-zachodniej części badanego terenu (Ryc. 5b).

a)



b)

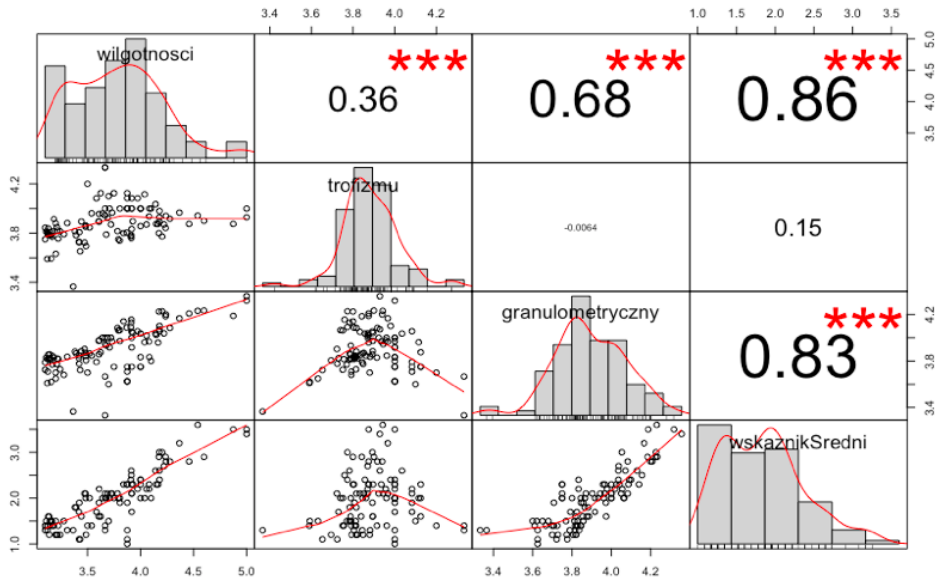


**Rycina 5.** Zróżnicowanie średnich wartości wskaźnika waloryzacji (a) i ich przestrzennego rozmieszczenia w dolinie rzeki Białej (b)

**Figure 5.** Differentiation of mean values of valorization index (a) and their spatial distribution Biała river valley (b)

### 4.3. Analiza statystyczna wskaźników ekologicznych i waloryzacji

W badaniach stwierdzono, że są istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi wskaźnikami ekologicznymi oraz pomiędzy wskaźnikami ekologicznymi i waloryzacji (Ryc. 6).



**Rycina 6.** Zależności pomiędzy wskaźnikami ekologicznymi i waloryzacji na podstawie współczynników korelacji r-Pearsona według klasyfikacji Guilforda

**Figure 6.** The relations between the ecological and valorization indices based on the correlation coefficients of r-Pearson according to the Guilford classification

Analiza wskaźników ekologicznych wykazała, że przestrzenne zróżnicowanie średnich wartości wskaźników wilgotności gleby jest wysoko skorelowane ze wskaźnikiem granulometrycznym podłoża (współczynnik korelacji  $r = 0,68$ ,  $p = 0,001$ ), oraz średnio skorelowane ze wskaźnikiem troficzności ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,001$ ) (Ryc. 6). Przestrzenne zróżnicowanie średnich wartości wskaźników troficzności jest natomiast ujemnie i bardzo słabo skorelowane ze wskaźnikiem granulometrycznym podłoża ( $r = -0,0064$ ,  $p = 0,001$ ) (Ryc. 6).

Analiza statystyczna wskaźników ekologicznych i waloryzacji wykazała, że przestrzenne zróżnicowanie średnich wartości wskaźników waloryzacji jest bardzo wysoko skorelowane ze wskaźnikiem wilgotności gleby ( $r = 0,86$ ,  $p = 0,001$ ) i ze wskaźnikiem granulometrycznym podłoża (współczynnik korelacji  $r = 0,83$ ,  $p = 0,001$ ) (Ryc. 6). Przestrzenne zróżnicowanie średnich wartości wskaźników

waloryzacji jest natomiast tylko słabo skorelowane ze wskaźnikiem troficzności ( $r = 0,15$ ,  $p = 0,001$ ) (Ryc. 6).

## 5. Wnioski

Rozkłady przestrzenne wartości wskaźników ekologicznych i waloryzacji, stwierdzone dla badanych płątów roślinnych, wskazują na dokonane w przeszłości zmiany regulacji koryta rzeki Białej i zmienne sposoby ich użytkowania (koszenie, brak koszenia, nasypy, wykopy, skarpy piaszczyste). Wysokie wskaźniki ekologiczne i/lub waloryzacji stwierdzone w miejscach doliny rzecznej, poza obecnym jej przepływem (nadrzeczny łęg wierzbowy, nadrzeczny łęg topolowy, szuwary turzycowe), mogą wskazywać na archiwalny przebieg niegdyś istniejącego koryta rzecznej Białej. Odtworzenie składu gatunkowego zbiorowisk roślinnych wcześniej w tym miejscu występujących i zgodnych z typem siedliska, pozwoli na przywrócenie stanu równowagi ekologicznej niegdyś funkcjonującej naturalnie rzeki Białej.

Określone w badaniach wskaźniki ekologiczne i waloryzacji szaty roślinnej rzeki Białej mogą być podstawą do działań w kierunku odtworzenia stanu najbardziej zbliżonego do naturalnego, który zapewni prawidłowe funkcjonowanie siedlisk mokradłowych i ich zbiorowisk roślinnych. Zapewni to zwiększenie się różnorodności biologicznej doliny rzecznej oraz wzmocni funkcje biologiczne rzeki Białej jako lokalnego korytarza ekologicznego do migracji zasobów genowych fauny i flory, czy też jako strefy przejścia (ekotonu) pomiędzy innymi zielonymi wyspami w mieście.

## Podziękowania

Badania sfinansowano ze środków na naukę MNiSW w ramach pracy Nr S/WBiIS/5/2016.

## Literatura

- Brunetta G., Voghera A. 2008. Evaluating Landscape for Shared Values: Tools, Principles, and Methods. *Landscape Res.*, 33(1): 71–87.
- Collinge S. K. 2009. *Ecology of Fragmented Landscapes*. Johns Hopkins University Press, Maryland, USA.
- Dembek W. 2002. Problemy ochrony i restytucji mokradel w Polsce. *Inż. Ekol. – Ekoinżynieria dla Ekorozwoju*, 6: 65–68.



- Dembek W., Grzyb M., Mikułowski M. 2002. Łąki i lasy w dolinach – nowe zagrożenia i szanse. *Post. Nauk Rol.*, 3: 87–119.
- Ferrari C., Pezzi G., Diani L., Corazza M. 2008. Evaluating landscape quality with vegetation naturalness maps: an index and some inferences. *Appl. Veg. Sci.*, 11: 243–250.
- Gamrat R., Burczyk P. 2007. Zbiorowiska roślinne doliny Warty na odcinku Santok–Stare Polichno. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 2(20): 127–136.
- Gamrat R., Kochanowska R., Niedźwiedzki E. 2010. Zróżnicowanie warunków siedliskowych i zbiorowisk roślinnych w dolinie Iny w okolicach Sowna. Część III. Zróżnicowanie zbiorowisk łąkowych na tle warunków glebowych. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 1(29): 157–165.
- Grzelak M., Janyszek M., Kaczmarek Z., Bocian T. 2008. Kształtowanie się różnorodności zbiorowisk szuwarowych z klasy *Phragmitetea* pod wpływem warunków siedliskowych. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 1(22): 99–108.
- Haber Z. 2001. Kształtowanie terenów zieleni z elementami ekologii. Wyd. AR, Poznań.
- Herbich J. (red.) 2004. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręczniki metodyczne. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- Kostecka J. 2010. Edukacyjne znaczenie pojęcia świadczenie ekosystemów dla ochrony awifauny miast. *Inż. Ekol.*, 22: 34–42.
- Kozłowska T. 2005. Zmiany zbiorowisk łąkowych na tle różnicowania się warunków siedliskowych w charakterystycznych obszarach dolin rzecznych Polski Centralnej. IMUZ, Falenty.
- Kryszak J., Grynia M. 2005. Zbiorowiska trawiaste siedlisk nadmiernie uwilgotnionych w dolinach rzecznych. *Łąkarstwo w Polsce*, 8: 97–106.
- Kryszak A., Kryszak J. 2007. Użytkowanie a walory przyrodnicze zbiorowisk łąkowych. *Fr. Agron.*, 3: 258–267.
- Kryszak A., Kryszak J., Grynia M., Czemko M. 2006. Dynamika zmian różnorodności florystycznej zbiorowisk trawiastych doliny Obry. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 1(16): 229–237.
- Kryszak A., Kryszak J., Klarzyńska A. 2008. Wpływ warunków siedliskowych i użytkowania na kształtowanie się *Arrhenatheretum elatioris*. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 8: 175–184.
- Kwiatkowski W., Gajko K. 2011. Ekofizjografia Białegostoku. Departament Ochrony Środowiska i Gospodarki Komunalnej Urzędu Miejskiego w Białymstoku.
- Łaska G. 2012. Różnorodność i walory przyrodnicze zbiorowisk mokradłowych w dolinie Białej, w centrum Białegostoku. *Inż. Ekol.* 29: 87–98.
- Łaska G. 2015. Numerical and digital methods in analysis of space-time changes and renewal of vegetation cover resources in the Czarna river valley. *J. Ecol. Eng.*, 16(4): 117–125.
- Mahon J. R., Miller R. W. 2003. Identifying high-value greenspace prior to land development. *J. Arboriculture*, 29(1): 25–33.

- Matuszkiewicz W. 2008. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. Wyd. PWN, Warszawa.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M. 2002. Flowering Plants and Pteridophytes of Poland. A Checklist. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Ochyra R., Żarnowiec J., Bednarek-Ochyra H. 2003. Census catalogue of Polish mosses. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Ociepa E., Kisiel A., Lach J. 2009. Ochrona wód powierzchniowych przed zrzutami cieków deszczowych z sieci kanalizacyjnych. Proceedings of ECOpole, 3(1).
- Oświt J. 2000. Metoda przyrodniczej waloryzacji mokradeł i wyniki jej zastosowania na wybranych obiektach. Materiały Infor. 35. Wydaw. IMUZ, Falenty.
- Pausas J. G., Rusch G. M., Leps J. 2003. Plant functional types in relation to disturbance and land use: Introduction. J. Veg. Sci., 4: 307–310.
- Piórkowski H. 2002. Kształtowanie szaty roślinnej, warunków siedliskowych i struktury przestrzennej krajobrazu doliny dolnej Pilicy pod wpływem antropopresji. [W:] Dembek W. (red.), Aktualne problemy ochrony mokradeł: walory przyrodnicze mokradeł a ich rolnicze użytkowanie. IMUZ, Falenty: 12–42.
- Roo-Zielińska E., Solon J., Degórski M. 2007. Ocena stanu i przekształceń środowiska przyrodniczego na podstawie wskaźników geobotanicznych, krajobrazowych i glebowych (Podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań). PAN, Instytut Geografii i Przestrzennego Zagospodarowania, Warszawa.
- Solon J., Roo-Zielińska E., Degórski M. 2012. Landscape scale of topography-soil-vegetation relationship: influence of land use and land form. Poli. J. Ecol., 60: 3–17.
- Tyszewski S., Kardel I. 2009. Studium hydrograficzne doliny rzeki Białej z wytycznymi do zagospodarowania rekreacyjno-wypoczynkowego i elementami małej retencji oraz prace hydrologiczne niezbędne do sporządzenia dokumentacji hydrologicznej. Warszawa.
- Zachariasz A. 2006. Zielen jako współczesny czynnik miastotwórczy ze szczególnym uwzględnieniem roli parków publicznych. Monografia 336. Wyd. Politechnik Krakowskiej, Kraków: 1–82.
- Zarzycki K., Trzcińska-Tacik H., Różański W., Szeląg Z., Wołek J., Korzeniak U. 2002. Ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków.
- <http://gisbialystok.pl> [dostęp: 10.09.2018]
- <http://www.qgis.org> [dostęp: 10.09.2018]
- <http://www.r-project.org> [dostęp: 10.09.2018]



## 2 Assessment of environmental conditions for creating artificial model coenopopulations of rare and endangered plant species

Alesia **Kruchonak** / Boris **Anoshenko** / Vladimir **Titok**

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus  
2-v Surganov Street, Minsk BY-220012, Belarus  
e-mail: kruchonak@gmail.com

**Abstract:** Ecological analysis was performed for localities of rare and endangered plant species in *ex situ* conditions in the Central Botanical Garden the National Academy of Sciences of Belarus (CBG). Artificial coenopopulations (CP) of *Astrantia major* L., *Allium ursinum* L., *Lunaria rediviva* L., *Hedera helix* L. were analyzed in CBG ecological space by estimating ecological valence, tolerance and biocompatibility. Comparison between ecological amplitudes and ecological optimums of species and actual ecological conditions at the site of the growth of the coenopopulation makes possible determination of the limiting CBG ecological factors. The studied CP during their existence on CBG territory showed a different degree of habitat condition development. The ecological fields in the CBG has the same climatic conditions, but differ in soil characteristics and light condition. In a number of cases, these factors are crucial for the success of artificial CP development. The CP most sensitive to the complex of factors is *Astrantia major* L. The use of Tsyganov's amplitude phytoindication scales and Ellenberg's point phytoindication scales allows objective assessment and justification of the plant eco-morphology for rare and endangered species in *ex situ* conditions, and permits a more accurate selection of new habitats for stenovalent species.

**Keywords:** artificial coenopopulations, phytoindication, *ex situ* conservation, ecological valence, biocompatibility, ecological efficiency

## 1. Introduction

Botanical gardens play a significant role in the implementation of programs for the conservation and reproduction of natural flora biodiversity. The most effective ways to restore the wealth of the plant world is a complex of methods of *in situ* and *ex situ* conservation. Translocation is the most widely used technique, which includes different levels and areas of interaction of *in situ* and *ex situ* methods: reintroduction, restoration and repatriation. To develop adequate models of translocation activities (reintroduction and repatriation), studies of the ecological space of the territory promising for translocation activities are necessary. The aim of this investigation was to create a unified quantitative rapid test for the determination of new habitats with a complex environmental conditions required for each plant species. Using the phytoindication method, it is possible to specify the plant community of a selected habitat with the complex of conditions that determine its specificity. Also, this method could determine the ecological tolerance and the biocompatibility of the repatriated species that would help to fit more accurately into the ecological space of the future habitat.

## 2. Material and methods

Artificial coenopopulations (CP) planted in the area of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (CBG) since 1999 have been investigated to test the ecological analysis in practice. These CPs have been steadily developing as the invasive type, successfully renewed and have even appeared at new localities.

*Astrantia major* L. – IUCN category CR (critically rare). – The natural range of the species covers the mountainous regions of Central Europe. There is only one population today in Belarus in Belovezhskaya Pushcha. The presence of another population in the Volkovysk district was not confirmed by the authors in 2016. There are two CP of *Astrantia major* in CBG: one of them was planted since 1999 and located on the border of alder and low-grass meadow grows with deficient lighting and another was planted since 2010 in artificial lowering on the mowed meadow with excessive moisture during spring.

*Allium ursinum* L. – category VU (vulnerable species). This Central European mountain species on the north-eastern border of the plain part of the range and it is assumed to be relict in Belarus. It grows in shady broad-leaved and spruce forests

near rivers and streams, on the outskirts of marshes and on islands in the marshes. There are two artificial CP in CBG: one of them was planted since 1999 under the canopy of broad-leaved trees on wet forest loose soils and another was planted since 2013 under the canopy of artificial tree plantations in places of intensive anthropogenic pressure and on soils with signs of excessive moisture due to underlying surface.

*Lunaria rediviva* L. – category NT (near threatened) is a potentially vulnerable species. Being relict and preboreal Central European nemoral species by origin, it is located in Belarus at island growing areas and individual localities near the north-eastern border of its range. There are three CP of this species: one of them was planted since 1999, phytocenosis of which is represented by anthropogenically transformed community, the second one is representing a spontaneous locality of previous CP growing in the hornbeam forest and the third one is located at the ecotone with low grass meadow and alder forest.

*Hedera helix* L. – category EN (endangered species). It is a relict and preboreal Central European mountain species by origin, it was found in island growing areas and individual localities on the eastern border of its range and beyond. The first CP of this species was established in the 1990s from the collection material of Belarusian origin and it is located in a pine forest and represented by a vegetative form. The another one, being the oldest CP than previous, is the result of merging the boundaries of two samples from the dendrological collection, one of which was introduced in 1957 from Yalta and another in 1964 from Batumi.

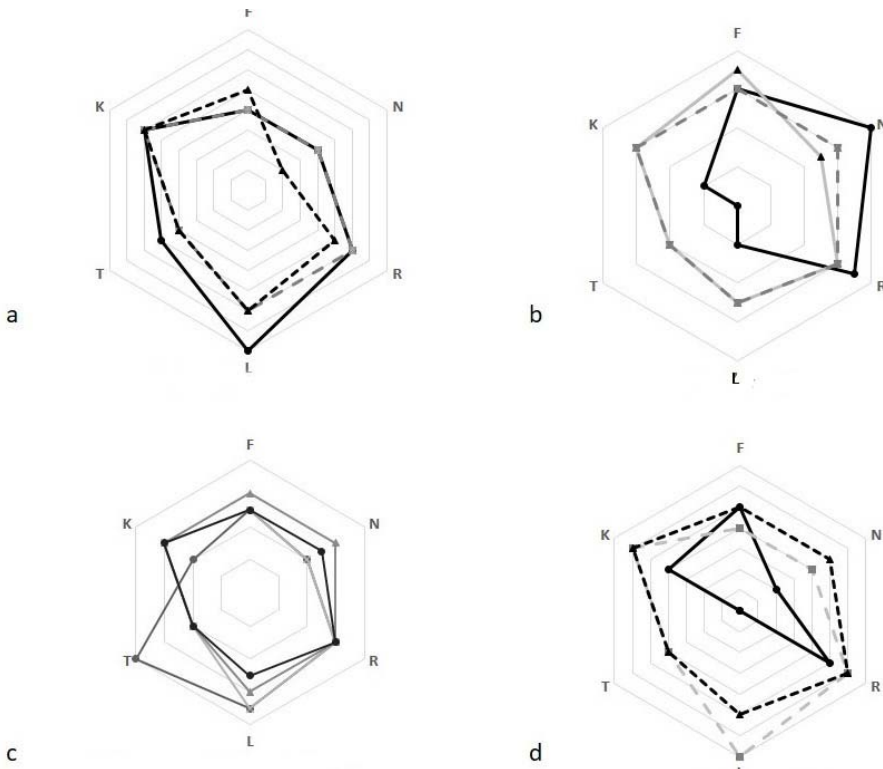
The methods of amplitude (Tsyganov 1983) and point phytointication (Ellenberg 1974) was used to characterize CPs and assess their ecological realization. It is known that species in an ecological field are located not only in the zone of optimal conditions, but also in zones of increasing and decreasing values of the factors describing these conditions up to the death zone. Such zones are called “the zones of oppression”. The optimal species conditions and their zones of oppression lying on both sides constitute the ecological amplitude of the species. The dimensions of such zones are species-specific and are not necessarily symmetrical and equal.

The ecological field of artificial habitats was calculated using the regression analysis of the ecological amplitudes of the vegetation community for comparison with the optimal indicators (Buzuk, Sozinov 2009). The ecological optimum for species was determined from Ellenberg’s tables (Ellenberg 1974). Point environmental indicators for real CPs were determined using instrumental measurements (luxometry, pH-metry), long-term climate observations and data from CBG soil maps.

The species opportunity in the habitat development determines its ecological valence. The potential ecological valence (PEV) is calculated by the ratio between the ecological scale scores of and the total score extent on the scale. The realized ecological valence (REV) is calculated for the conditions of specific CPs. The ratio between PEV and REV is the coefficient of ecological efficiency (K.ec.eff) (Zhukova 2010), which determines the degree of environmental potencies by the species.

### 3. Results

The species potential ecological optimums (Ellenberg 1974) are shown in Fig. 1 by the solid black line and other lines demonstrate the actual CPs placement in CBG ecological space.



**Figure 1.** Ecological optimum (black solid line) and actual ecological conditions of artificial coenopopulations in the Central Botanical Garden for *Astrantia major* (a), *Allium ursinum* (b), *Hedera helix* (c), *Lunaria rediviva* (d). Ecological indicators: F – soil humidification, N – soil nitrogen content, R – soil acidity, L – illuminance, T – temperature factor, K – continental climate rate

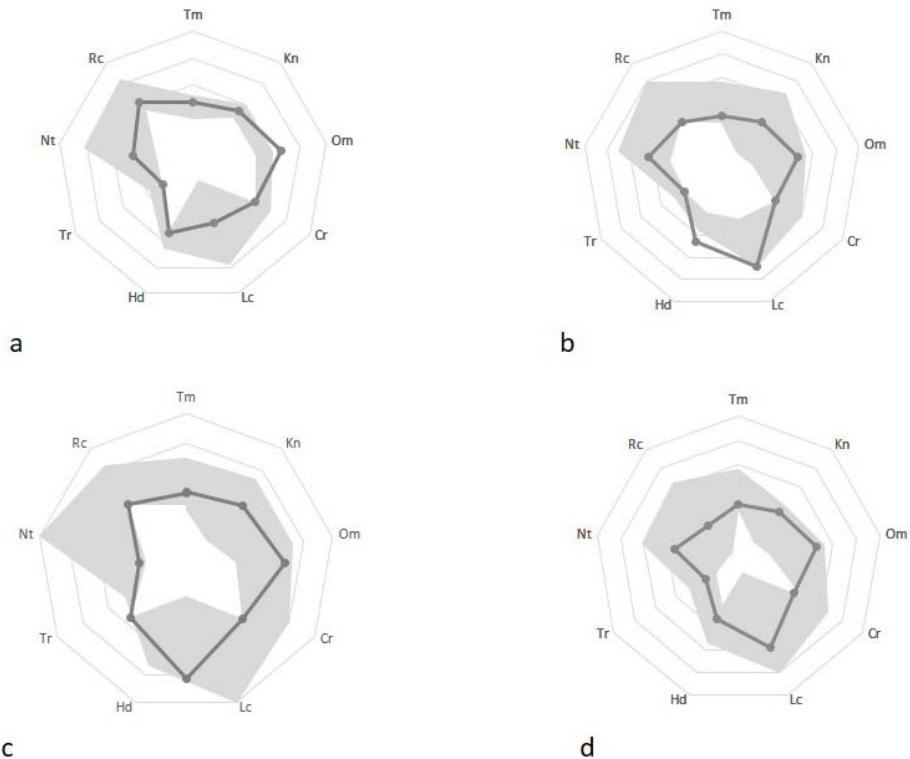
Two artificial localities of *A. major* are placed in conditions close to its optimum with minor illuminance and temperature deficiency however one of them grows in the conditions with considerable nitrogen deficiency and soil moisture excess (Fig. 1a). The conditions of all localities of *A. ursinum* are far from optimum for this species except for soil moisture content and acidity (Fig. 1b). It is known that *A. ursinum* prefers rich humus soil and in the CBG conditions it grows under inhibition by this factor. This indicates that actual placement of these localities needs correction or even the populations need translocation. The ecological conditions of three *L. rediviva* localities are almost the same and not optimal in terms of geoclimatic (continental climate excess and temperature deficiency) and soil (nitrogen deficiency) factors (Fig. 1c). Nevertheless, these localities are well developed and form spontaneous affiliated localities in CBG. Analysis of *H. helix* localities showed that their ecological conditions are in excess to its optimum except for soil moisture content (Fig. 2d). It is known that limiting factor of this species dispersion is isotherm equal to 4.3<sup>°C</sup>. Unfortunately, Ellenberg scale does not include thermo-climatic factors.

Comparison between optimal and actual ecological factors allows not only identification of the limiting factors for each CP that restrict their development but also determination of the ways of their timely correction if limiting factor is not geoclimatic one. Estimation of potential and actual (implemented) ecological possibilities could be provided by comparison between species amplitude values and actual geoclimatic factors for each CP (Tsyganov 1983).

Analysis of ecological amplitudes allows detection of species ecological flexibility and estimation of the actual growing condition in the limits of ecological factors. It was found that all four species studied are mainly localized in the limits of their ecological range (Fig. 2). Growing conditions of *L. rediviva*, *H. helix* and *A. major* correspond to their both geoclimatic and edaphic factors. Analysis of *A. ursinum* growth conditions revealed the soil moisture excess and deficiency of mineral nutrition, soil acidity and crioclimatic factors that are in agreement with the previous analysis by Ellenberg's scales.

Implemented (REV) and potential (PEV) ecological valency was calculated by Zhukova (2010) and ecological efficiency coefficient was calculated as  $K_{ec.eff} = (REV/PEV) \cdot 100\%$  and ecological tolerance index as  $It = \sum PEV / \sum$  (studied factor scales) (Turmuhamedova et al. 2013).





**Figure 2.** Potential (shaded area) and implemented (lines) ecological conditions for *Astrantia major* (a), *Allium ursinum* (b), *Hedera helix* (c), *Lunaria rediviva* (d) in the Central Botanical Garden.

Geoclimatic factors: Kn – climate continentality, Cr – crioclimate, Tm – thermoclimate, Om – ombrogenity, aridity and humidity, Lc – illuminance; edaphic factors: Hd – soil humidification, Tr – mineral nutrition, Rc – soil acidity, Nt – soil nitrogen content

Species sensitivity to each ecological factor was detected by the coefficient of ecological valency (Tab. 1). Stenovalent species having value less than 1/3 of ecological scale could be called sensitive ones. Mesovalent species are placing in the middle of ecological scale. Euryvalent species having value greater than 2/3 of ecological scale could be called tolerant and stable ones. Results obtained detected that all artificial cenopopulations studied are stenovalent to soil nitrogen content and crioclimatic factors. *A. major* is also sensitive to climate continentality, ombrogenity and mineral nutrition. *H. helix* and *L. rediviva* are stenovalent to high light conditions and soil humidification.

**Table 1.** Ecological efficiency coefficient for artificial coenopopulations of Belarus rare and endangered species in conditions of the Central Botanical Garden

Species	Ecological factors*							
	Tm	Kn	Om	Cr	Lc	Hd	Tr	Nt
<i>Astrantia major</i>	0.40	0.15	0.30	0.15	0.43	0.40	0.33	0.14
<i>Allium ursinum</i>	0.70	0.50	0.80	0.25	0.60	0.60	0.66	0.33
<i>Hedera helix</i>	0.70	0.35	0.80	0.25	0.11	0.22	0.50	0.22
<i>Lunaria rediviva</i>	0.70	4.40	0.70	0.25	0.25	0.34	0.41	0.33

\* Abbreviations are the same as in Fig. 2.

Calculation of tolerance degree to each factor is rather complex and tolerance index (It) representing species reaction to factor set (Turmuamedova et al. 2013) was used for estimating relationship between species and environment conditions for CP studied. It is calculating by ratio between relative sums of species potential ecological valencies and studied factor scales.

This index allows the species tolerant group (bionicity) to be identified. Distribution of species into tolerant groups is based on the same approach as for the distribution of species into the ecological valency fractions: stenovalent (SV) and stenobiont (SB) (valency or tolerance index is less than 0.33), hemistenovalent (HSV) or hemistenobiont (HSB) (0.34–0.45), mesostenovalent (MSV) or mesostenobiont (MSB) (0.46–0.56), hemieuryvalent (HEV) and hemieurybiont (HEB) (0.57–0.66).

All species studied in CBG conditions were sensitive to climatic factors and less sensitive to edaphic factors except *L. rediviva* (Tab. 2). Least ecological flexibility was revealed for CP of *A. major*.

## 4. Discussion

All four objects belong to the rare and protected species of Belarus natural flora. The CPs studied during their growth in the area of CBG showed a different abilities to colonize the habitat. The CBG ecological space has appropriate climatic conditions for development of species studied but all tested habitats differ in soil conditions and illumination. For a number of plants these factors are crucial for the success in creating artificial CP.

**Table 2.** Ecological valency and tolerance of Belarus rare and endangered species in the Central Botanical Garden

Species	Climatic factors			Edaphic factors		
	climate It	fraction of ecovalency	group of tolerance	soil It	fraction of ecovalency	group of tolerance
<i>Astrantia major</i>	0.21	SV*	SB	0.35	HSB	HSB
<i>Allium ursinum</i>	0.49	MB	MB	0.38	HSB	HSB
<i>Hedera helix</i>	0.44	HSV	HSB	0.59	HSB	HSB
<i>Lunaria rediviva</i>	0.45	HSB	HSB	0.40	HSB	HSB

\*abbreviations are explained in text.

The values of potential and realized ecological valence indicate the cryoclimatic factor as the limiting factor at zonal and regional levels for the species studied. This limits the distribution of species in vegetation zones. At the local level, the limiting factors are the soil nitrogen availability and the illumination. The species most sensitive to the complex of ecological factors is *Astrantia major*. Simultaneous use of amplitude and point scales allows objective assessment of the ecological concordance and indicates proper measures to be undertaken, e.g. translocation or exact selection of a new habitat for stenovalent species.

## References

- Buzuk G., Sozinov O. 2009. Regressivny analiz v fitoindikacii (na primere ekologicheskikh shkal D. Tsyganova). *Botanika*, 37: 356–362.
- Ellenberg H. 1974. *Zeigerwerte der Gefasspflanzen Mitteleuropas*. Göttingen:Goltze.
- Tsyganov D. 1983. Fitoindikacija ekologicheskikh rezhimov v podzone hvojno-shirokolistvennyh lesov.
- Turmuhamedova N., Zhukova L, Dorogova Yu. 2013. Ekologicheskaja harakteristika nekotoryh vidov rastenij. *Ontogeneticheskij atlas rastenij*. VII: 289–296.
- Zhukova L. 2010. Ekologicheskie shkaly I metody analiza ekologicheskogo raznoobrazija rastenij.

Grażyna Łaska / Aneta Sienkiewicz

Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,  
Katedra Inżynierii Rolno-Spożywczej i Kształtowania Środowiska  
ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok

e-mail: a.sienkiewicz@pb.edu.pl

**Streszczenie:** Modelowanie matematyczne – jako dziedzina interdyscyplinarna – pełni szczególną rolę w analizie danych środowiskowych. Badania modelowe to jedno z podstawowych narzędzi stosowanych, między innymi, w procesie symulowania zasięgów występowania gatunków zagrożonych, identyfikacji gatunków zagrożonych wyginięciem, symulacji wpływu zmian klimatycznych na ekosystemy oraz modelowania dynamiki populacji ginących i zagrożonych gatunków. Liczne możliwości zastosowania modelowania matematycznego w badaniach środowiskowych umożliwiają zrozumienie funkcjonowania złożonych struktur występujących w badanych układach ekologicznych. Wykorzystanie algorytmów matematycznych zapewnia wgląd we właściwości modelowanego układu, które wynikają z jego struktury i często nie są widoczne z punktu widzenia pojedynczej jednostki układu. Modelowanie pozwala także na analityczne powiązanie układu z dynamiką zmian poszczególnych jego elementów. Opracowana topologia modelu daje podstawy do wnioskowania na temat funkcjonowania złożonego układu ekologicznego i jego odpowiedzi na wprowadzane zmiany w warunkach występowania zaburzeń. Analizy matematyczne mają fundamentalne znaczenie w badaniach środowiskowych, ponieważ wspomagają podejmowanie decyzji zapewniających prawidłowe funkcjonowanie naturalnego układu ekologicznego i umożliwiają określenie, w warunkach symulacji komputerowej, optymalnych poziomów parametrów środowiska wpływających korzystnie na zachowanie całości struktury. Celem pracy jest przegląd wybranych metod modelowania matematycznego (w oprogramowaniu Stella, w sztucznych sieciach neuronowych, w sieciach bayesowskich) w badaniach środowiskowych, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich zastosowania w ocenie stanu zachowania zagrożonych wyginięciem gatunków roślin.

**Słowa kluczowe:** algorytmy matematyczne, układ ekologiczny, zależności przyczynowo-skutkowe, symulacja komputerowa, optymalizacja

# 3 Mathematical modelling in environmental research

Grażyna Łaska / Aneta Sienkiewicz

Białystok University of Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering,  
Department of Agricultural, Food Engineering and Environmental Management  
45A, Wiejska Street, 15-351 Białystok, Poland

e-mail: a.sienkiewicz@pb.edu.pl

**Abstract:** Mathematical modelling as an interdisciplinary field plays a special role in analysis of environmental data. Model research is one of the basic tools used, among others, in the process of simulating the ranges of occurrence of endangered species, identification of endangered species, simulation of the impact of climate change on ecosystems and modelling the population dynamics of endangered species. Numerous application of mathematical modelling in environmental research make it possible to understand the functioning of complex structures of interrelated elements found in the studied ecological systems. The use of mathematical algorithms provides insight into the properties of the modeled system that result from its structure and are often not visible from the point of view of a single unit of the system. It also allows analytical integration of the system with the dynamics of changes in its individual elements. The developed topology of the model also provides the basis for inference about the functioning of the complex ecological system and its response to the changes introduced in the conditions of disorders. Mathematical analyzes have fundamental importance in environmental research because they support making decisions that ensure the proper functioning of natural ecological systems and enable determination, by computer simulation, of the optimal levels of environmental parameters that positively affect the behavior of its structure. The study was undertaken to review the selected methods of mathematical modelling (Stella software, artificial neural networks, Bayesian networks) in environmental research, with particular emphasis on the possibility of their application in the assessment of the conservation of endangered plant species.

**Keywords:** mathematical algorithms, ecological system, cause and effect relationships, computer simulation, optimization

## 1. Wstęp

Modelowanie matematyczne znajduje szerokie zastosowanie w analizie danych środowiskowych. Badania wielu autorów potwierdzają możliwości wykorzystania modeli matematycznych w procesie symulowania zasięgów występowania gatunków zagrożonych (Attorre i in. 2013), identyfikacji gatunków zagrożonych wyginięciem (Parviainen i in. 2009), symulacji wpływu zmian klimatycznych na ekosystemy (Fang i in. 2013) oraz modelowania dynamiki populacji ginących i zagrożonych gatunków (Beissinger, McCullough 2002; Morris, Doak 2002). Modele matematyczne są także wykorzystywane do symulowania kierunków działań ochronnych i oceny ich skutków (Frank, Wissel 2002; Leslie i in. 2003). Ma to szczególne znaczenie w przypadku zachowania zagrożonych wyginięciem taksonów roślin. Analiza matematyczna środowiska przyrodniczego, jako złożonego układu czynników biotycznych i abiotycznych, znajduje zastosowanie w ocenie stanu zachowania populacji roślin. Opracowanie formalnego opisu badanego układu ekologicznego, ustalenie algorytmu wyznaczania wartości liczbowych poszukiwanych parametrów oraz sprawdzenie zgodności opracowanego modelu z układem ekologicznym umożliwia określenie istotnych statystycznie związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy parametrami środowiska a biologią rozwoju i dynamiką zagrożonych taksonów roślin. Symulacja komputerowa z wykorzystaniem modelu matematycznego pozwala ustalić optymalne zakresy badanych zmiennych wpływających korzystnie na dalszą egzystencję zagrożonych gatunków roślin.

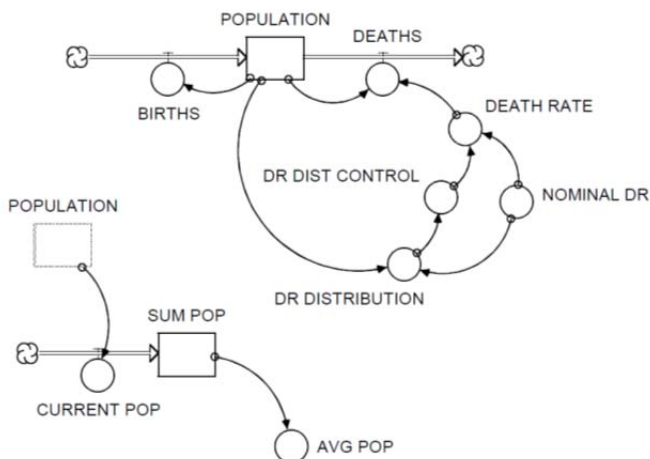
Jednym z najbardziej popularnych narzędzi stosowanych w procesie modelowania danych środowiskowych, są sieci ekologiczne. Modelowanie z ich zastosowaniem umożliwia zrozumienie funkcjonowania złożonych struktur wzajemnie powiązanych ze sobą elementów występujących w układach ekologicznych (Aloy, Russell 2004; Green i in. 2005; Proulx i in. 2005). Wykorzystanie sieci umożliwia także wgląd we właściwości modelowanego układu, które wynikają ze struktury sieci i nie są widoczne z punktu widzenia pojedynczej jednostki układu. Zastosowanie sieci wzajemnych powiązań w badaniach środowiskowych pozwala na powiązanie analityczne modelowanego układu z dynamiką zmian poszczególnych jego elementów (Jordán, Scheuring 2004). Opracowana topologia sieci połączeń daje podstawy do wnioskowania na temat funkcjonowania złożonego układu ekologicznego i jego odpowiedzi na wprowadzane zmiany w warunkach występowania zaburzeń (Jordán 2001; Dambacher i in. 2003; Proulx i in. 2005). Opracowany model matematyczny – w postaci sieci wzajemnych powiązań, wspomaga podejmowanie decyzji zapewniających prawidłowe funkcjonowanie układu ekologicznego (Rooney 2001; Reynolds 2005; Jensen i in. 2009). Umożliwia on również określenie

optymalnych poziomów analizowanych parametrów środowiskowych wpływających korzystnie na funkcjonowanie modelowanego układu ekologicznego. Celem pracy jest przegląd wybranych metod modelowania matematycznego (w oprogramowaniu Stella, w sztucznych sieciach neuronowych, w sieciach bayesowskich) w badaniach środowiskowych ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich zastosowania w ocenie stanu zachowania zagrożonych wyginieciem gatunków roślin.

## 2. Metody modelowania matematycznego w ocenie stanu zachowania zagrożonych gatunków roślin

### 2.1. Modelowanie matematyczne z zastosowaniem oprogramowania Stella

Jedną z metod modelowania układów ekologicznych jest opracowanie modeli matematycznych z zastosowaniem oprogramowania Stella II (Johnston 1994). Szczególną rolę w ocenie stanu zachowania zagrożonych wyginieciem gatunków roślin pełni modelowanie dynamiki populacji na podstawie zmian jej liczebności (Hannon, Ruth 1997). Zdefiniowany schemat strukturalny modelu dynamiki populacji składa się ze zmiennych przedstawionych za pomocą ikon określających stany zmiennych, przepływy pomiędzy nimi, informacje o przepływach oraz zmienne pomocnicze. Modelowanie układu ekologicznego odbywa się na podstawie przekształcenia opracowanego schematu modelu graficznego w model matematyczny opisany układem równań różniczkowych (High Performance Systems Inc. 1996; Costanza, Voinov 2001). W modelowaniu dynamiki populacji zagrożonych wyginieciem gatunków przyjęto, że liczebność populacji, będąca parametrem wejściowym do budowy modelu, wzrasta wykładniczo z tytułu wskaźnika urodzeń i maleje proporcjonalnie do wskaźnika śmiertelności (Hannon, Ruth 1997). W procesie modelowania matematycznego układu ekologicznego założono także, że zmiana wielkości populacji, będąca wynikiem procesów rozrodczości i śmiertelności osobników, nie zależy od naturalnych czynników zaburzeń, takich jak presja roślinożerców, antropopresja i zmiany klimatyczne. W celu odwzorowania zmian wielkości wskaźnika śmiertelności, opracowany układ zależności przyczynowo-skutkowych rozwinięto w schemacie strukturalnym modelu o wielkość nominalną wskaźnika śmiertelności. Parametr ten zdefiniowano poprzez wprowadzenie do struktury modelu zmiennej określającej rozkład wskaźnika śmiertelności, który jest zależny od wartości parametrów statystycznych w postaci średniej i odchylenia standardowego (Ryc. 1).



- $POPULATION(t) = POPULATION(t - dt) + (BIRTHS - DEATHS) * dt$   
 INIT POPULATION = 267  
 INFLOWS:  
 ☞ BIRTHS =  $0.26 * POPULATION$   
 OUTFLOWS:  
 ☞ DEATHS =  $DEATH\_RATE * POPULATION$
- $SUM\_POP(t) = SUM\_POP(t - dt) + (CURRENT\_POP) * dt$   
 INIT SUM\_POP = 0  
 INFLOWS:  
 ☞ CURRENT\_POP = IF TIME>0 THEN POPULATION ELSE 0
- AVG\_POP = IF TIME>0 THEN  $SUM\_POP / (TIME - 0)$  ELSE 0
- DEATH\_RATE = (IF DR\_DIST\_CONTROL > NOMINAL\_DR THEN DR\_DIST\_CONTROL ELSE NOMINAL\_DR) \*  $1 + 0 * DR\_DIST\_CONTROL + 0 * NOMINAL\_DR$
- DR\_DISTRIBUTION = NORMAL (NOMINAL\_DR,  $0.005 * POPULATION$ )
- DR\_DIST\_CONTROL = IF (DR\_DISTRIBUTION >= 0.01) AND (DR\_DISTRIBUTION <= 1) THEN DR\_DISTRIBUTION ELSE 0.01
- NOMINAL\_DR =  $(EXP(-.01 * TIME) * .19 + .01) * 1 + .07 * 0$

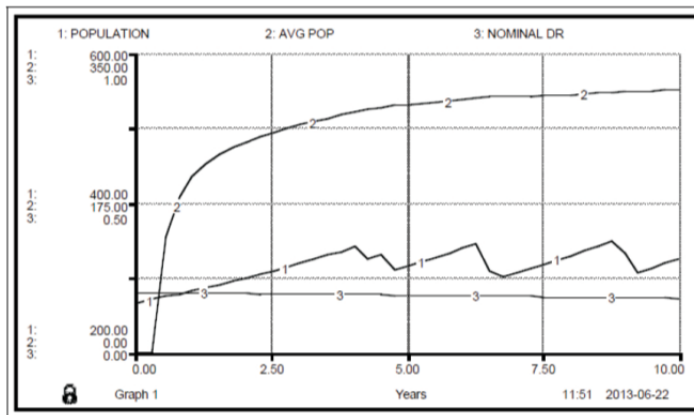
**Rycina 1.** Schemat struktury modelu dynamiki populacji zagrożonego wyginięciem gatunku oraz zależności matematyczne opisujące parametry modelu opracowane z zastosowaniem oprogramowania Stella II (Hannon, Ruth 1997; numer licencji 4458741371473)

**Figure 1.** Schematic structure of the population dynamics model of endangered species and mathematical relationships describing the parameters of the model developed using software Stella II (Hannon, Ruth 1997; license number 4458741371473)

Opracowanie schematu struktury i zdefiniowanie zmiennych wejściowych do budowy matematycznego modelu dynamiki populacji, pozwoliło na dokonanie procesu symulacji komputerowej, umożliwiającej prognozowanie liczebności badanej populacji w funkcji czasu. W celu wnioskowania na temat możliwości zachowania populacji zagrożonego wyginięciem taksonu, w opracowanym układzie wzajemnych zależności matematycznych uwzględniono średnią liczebność populacji.



Parametr ten określono jako iloraz liczby osobników w badanej populacji w zdefiniowanym czasie do przyjętego okresu obliczeń (Hannon, Ruth 1997). Zastosowanie zależności matematycznych, opisujących średnią liczebność badanej populacji, umożliwiło prognozowanie trendu zmian jej liczebności oraz określenie dalszej egzystencji zagrożonego wyginięciem taksonu przy uwzględnieniu nominalnej wartości wskaźnika śmiertelności (Ryc. 2).



**Rycina 2.** Komputerowy model symulacyjny dynamiki populacji zagrożonego wyginięciem gatunku, opracowany z zastosowaniem oprogramowania Stella II (Łaska, Sienkiewicz 2015)

**Figure 2.** Computer simulation model of the population dynamics of endangered species using software Stella II (Łaska, Sienkiewicz 2015)

Na podstawie wyników symulacji komputerowej można stwierdzić, że liczebność badanej populacji ulega dynamicznej zmianie zgodnie z poziomem nominalnego wskaźnika śmiertelności dla przyjętego okresu prognozowania wynoszącego 10 lat. Zaobserwowano przyrost liczebności osobników w badanej populacji i średniej liczebności populacji dla tego okresu, przy uwzględnieniu zmian w zakresie wielkości nominalnej wskaźnika śmiertelności. Prognozowane liczebności badanej populacji w poszczególnych latach przyjętego okresu symulacji wskazują, że tempo wzrostu liczby osobników jest względnie stałe, występują jednak okresowe wahania związane ze spadkiem liczebności osobników. Wyniki symulacji komputerowej, przeprowadzonej na podstawie zdefiniowanego układu wzajemnych zależności przyczynowo-skutkowych pozwalają stwierdzić, że przy niskim poziomie nominalnego wskaźnika śmiertelności i przy uwzględnieniu stałego poziomu wskaźnika urodzeń, prawdopodobieństwo zagrożenia badanej populacji, spowodowane spadkiem liczebności jest niewielkie. Prognozowane okresowe wahania liczebności

osobników w badanej populacji nie przewyższają całkowitej liczebności populacji przyjętej jako wielkość wejściowa do budowy modelu. Wykorzystanie modelu opisanego układem algorytmów matematycznych w procesie symulacji komputerowej daje podstawy do wnioskowania, że jest to dynamicznie rozwijająca się populacja, w której występuje przyrost liczebności osobników w zadanej funkcji czasu, przy pominięciu wpływu czynników biotycznych i abiotycznych środowiska przyrodniczego (Ryc. 2). Wykorzystanie oprogramowania Stella do modelowania dynamiki populacji zagrożonych wyginięciem gatunków daje podstawy do wnioskowania na temat wzajemnych interakcji pomiędzy elementami badanego układu ekologicznego oraz umożliwia ocenę możliwości zachowania populacji w czasie.

## 2.2. Modelowanie matematyczne z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych

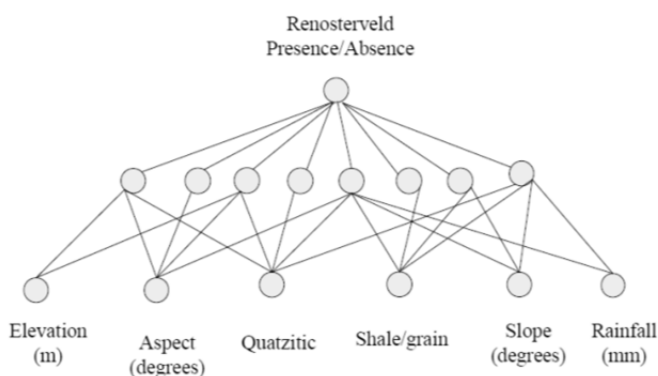
Kolejną metodą modelowania matematycznego układów ekologicznych jest metoda uczenia maszynowego w postaci sztucznych sieci neuronowych (Tadeusiewicz 1993). Sztuczne sieci neuronowe (ANNs – *artificial neural networks*) umożliwiają rozwiązanie zagadnień związanych z tworzeniem modeli matematycznych, pozwalających odwzorować złożone zależności pomiędzy sygnałami wejściowymi a wybranymi sygnałami wyjściowymi w sieci (Tadeusiewicz 1993). Metoda ta pełni szczególną rolę w ocenie stanu zachowania populacji zagrożonych taksonów, ze względu na możliwość szybkiej adaptacji modelowanego układu do zmiennych warunków środowiska (Osowski 2000). Sieci neuronowe postrzegane są jako „czarna skrzynka”, gdyż nie do końca można wyjaśnić wpływ analizowanych zmiennych wejściowych na otrzymaną wielkość wyjściową w modelowanej sieci. Pozyskiwanie wiedzy na temat możliwości zachowania populacji taksonów zagrożonych wyginięciem odbywa się na podstawie informacji uzyskanych z nauczonej sztucznej sieci neuronowej w postaci zapisu „jeżeli-to”. Opracowana struktura modelu sztucznej sieci neuronowej składa się z warstw i neuronów tworzących poszczególne warstwy sieci (Tadeusiewicz, Lula 2003). Działanie sztucznej sieci neuronowej wyrażane jest równaniem (Tadeusiewicz 1993):

$$S_j^l = g_j \left( \sum_{i=1}^m S_i^{l-1} w_{ji}^l - \theta_j^l \right)$$

gdzie:

$S_j^l$  – wielkość wyjściowa neuronu  $j$  w warstwie  $l$ ,  $S_i^{l-1}$  – wielkość wyjściowa neuronu  $i$  w warstwie  $l - 1$  (zawierającej  $m$  neuronów),  $w_{ji}^l$  – waga połączeń,  $\theta_j^l$  – wartość progowa neuronu,  $g_j$  – funkcja dyskryminacji

W modelowaniu stanu zachowania populacji taksonów zagrożonych wyginięciem, w celu określenia wielkości wyjściowej modelu, przyjęto sześć wielkości w warstwie wejściowej oraz osiem wielkości w warstwie ukrytej (Ryc. 3). W warstwie wejściowej uwzględniono parametry środowiska przyrodniczego, wpływające w największym stopniu na zachowanie populacji. Do modelowanej sieci wprowadzono zmienne w postaci wysokości terenu, aspektu geograficznego, zawartości minerałów w glebie, nachylenia terenu oraz wielkości rocznej sumy opadów. Wpływ analizowanych parametrów środowiskowych na stan zachowania populacji przedstawiono w postaci zmiennej na wyjściu modelowanej sieci neuronowej, obrazującej obecność lub brak obecności osobników w badanej populacji (Ryc. 3).

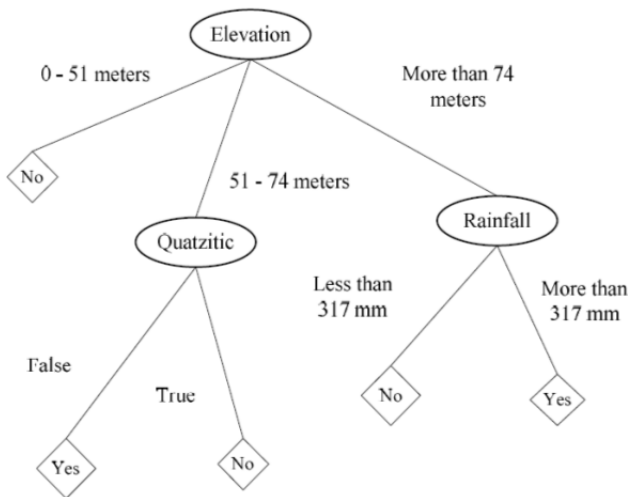


**Rycina 3.** Topologia struktury sieci neuronowej wpływu czynników abiotycznych środowiska na stan zachowania zagrożonych wyginięciem populacji (Chandra, Omlin 2007; zgoda wydawnictwa)

**Figure 3.** Topology of neural network structure of the impact of environmental abiotic factors on the conservation of endangered population (Chandra, Omlin 2007; publishing agreement)

Zdefiniowanie zmiennych środowiskowych w modelu i nadanie wagi dla każdej wielkości wejściowej umożliwiło przeprowadzenie procesu uczenia sieci neuronowej z zastosowaniem algorytmów matematycznych. Proces uczenia z nadzorem eksperta umożliwił skorygowanie wartości współczynników wagowych przez algorytmy matematyczne w celu uzyskania oczekiwanej wielkości na wyjściu modelowanej sieci neuronowej. Opracowaną topologię struktury układu ekologicznego, uwzględniającą wpływ czynników biotycznych i abiotycznych środowiska przyrodniczego na zachowanie zagrożonych wyginięciem populacji, poddano następnie wielokrotnemu testowaniu na zbiorze danych testujących (Chandra, Omlin 2007).

Proces testowania modelowanej sieci neuronowej i uzyskanie wysokiej skuteczności działania w opracowaniu układu wzajemnych zależności pomiędzy zmiennymi pozwoliło na eksplorację pozyskanej wiedzy w postaci drzewa decyzyjnego (ang. *decision tree*; Ryc. 4). Znajomość podstawowych zmiennych wpływających na zachowanie badanej populacji umożliwia wskazanie zakresu czynników środowiska zapewniających prawidłowe funkcjonowanie populacji. Prognozowanie stanu zachowania populacji z wykorzystaniem metody uczenia maszynowego w postaci sieci neuronowej i eksploracji uzyskanej wiedzy pozwala stwierdzić, że przetrwanie badanej populacji jest możliwe przy wysokości terenu od 51 do 74 metrów i braku obecności kwarcytu w podłożu oraz przy wysokości terenu powyżej 74 metrów i obecności opadów powyżej 317 milimetrów (Ryc. 4). Proces modelowania wzajemnych zależności przyczynowo-skutkowych w analizowanym układzie ekologicznym umożliwia także określenie zakresu warunków środowiskowych, w których funkcjonowanie populacji jest mocno zaburzone lub niemożliwe. Stwierdzono, że przy wysokości terenu poniżej 51 metrów liczebność badanej populacji ulegnie prawdopodobnie zmniejszeniu – ze względu na brak korzystnych warunków środowiskowych (Ryc. 4).



**Rycina 4.** Drzewo decyzyjne opracowane na podstawie wiedzy uzyskanej z modelu sieci neuronowej wpływu czynników abiotycznych środowiska na stan zachowania zagrożonych wyginięciem populacji (Chandra, Omlin 2007; zgoda wydawnictwa)

**Figure 4.** Decision tree developed on the basis of knowledge obtained from the neural network model of the impact of environmental abiotic factors on the conservation of endangered population (Chandra, Omlin 2007; publishing agreement)

Neuronowy system ekspercki, łączący zalety sieci neuronowych i systemu eksperckiego (Sima 1995), wykorzystuje nauczoną sieć neuronową, co sprawia, że pozyskana wiedza z sieci pozwala ocenić możliwości zachowania zagrożonych taksonów. Zastosowanie neuronowego systemu eksperckiego do określenia wpływu warunków środowiskowych na zachowanie naturalnego układu ekologicznego, daje podstawy do wspomagania procesu podejmowania decyzji zapewniających prawidłowe funkcjonowanie badanej populacji. Pozyskanie wiedzy na temat możliwości zachowania populacji zagrożonych wyginięciem gatunków, na podstawie opracowanej topologii sieci neuronowej, odgrywa szczególnie ważną rolę przy podejmowaniu decyzji obarczonych znacznym ryzykiem (Chandra, Omlin 2007).

### 2.3. Modelowanie matematyczne z zastosowaniem sieci bayesowskich

Kolejną metodą modelowania układów ekologicznych jest metoda odnosząca się do podstaw teorii decyzji w postaci sieci bayesowskich. Metoda ta pełni szczególnie rolę w modelowaniu matematycznym stanu zachowania zagrożonych wyginięciem populacji – ze względu na możliwość przeprowadzenia procesu symulacji i optymalizacji wpływu biotycznych i abiotycznych czynników środowiska. Sieci bayesowskie (BNs – *Bayesian networks*) jako wielowymiarowe modele probabilistyczne, umożliwiają uzyskanie wiedzy o wzajemnych zależnościach przyczynowo-skutkowych pomiędzy modelowanymi czynnikami, bazując na teorii prawdopodobieństwa. Twierdzenie Bayesa wyrażane jest równaniem (Drużdżel 2005):

$$P(A|B) = P(A,B)/P(B) = P(B|A)/P(B) \cdot P(A)$$

gdzie:

$P(A|B)$  – jest to prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia A zależnego od zdarzenia B – a więc A jest prawdziwe, jeśli B miało miejsce

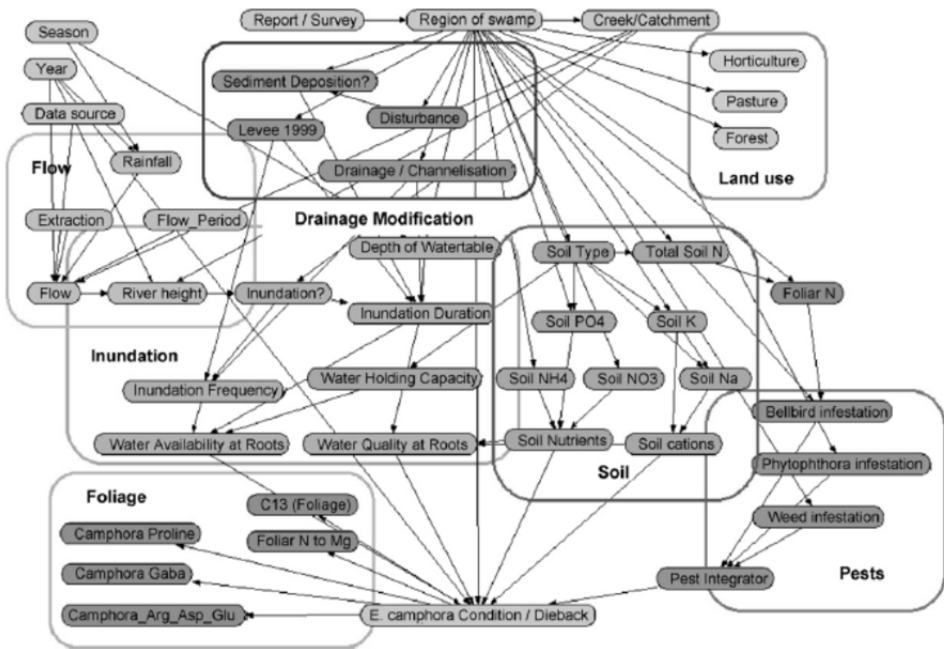
Prawdopodobieństwo to jest ilorazem prawdopodobieństw  $P(B|A)/P(B)$ , wyrażającym jak ważne jest zdarzenie B w odniesieniu do zdarzenia A, oraz prawdopodobieństwa zdarzenia  $P(A)$  wyliczonego przed zaistnieniem zdarzenia B (Drużdżel 2005).

Sieć przyczynowo-skutkowa modelowana jest za pomocą skierowanego grafu acyklicznego (zbioru wierzchołków połączonych krawędziami, który nie posiada cykli), w którym wierzchołki reprezentują analizowane zmienne, a krawędzie obrazują probabilistyczne powiązania pomiędzy nimi (Jensen 2001; Drużdżel 2005; Pourret i in. 2008; Aguilera i in. 2011). Wykorzystanie algorytmów modelowania w sieciach bayesowskich (GeNIe 2.0, University of Pittsburgh) pozwala na integrację analityczną parametrów środowiskowych z cechami zagrożonych wyginięciem

gatunków. Proces modelowania, obejmujący określenie zmiennych, zdefiniowanie połączeń pomiędzy zmiennymi, wprowadzenie danych do sieci oraz wyznaczenie rozkładów prawdopodobieństw zmiennych modelu, umożliwia uzyskanie wzajemnych zależności pomiędzy biologią rozwoju i dynamiką zagrożonych taksonów a oddziaływaniem czynników środowiska (Marín i in. 2003; Newton i in. 2007; Pollino i in. 2007a; Łaska, Sienkiewicz 2013, 2014). Opis jakościowy sieci, oparty na graficznej strukturze modelu, pozwala identyfikować warunkowe zależności pomiędzy analizowanymi zmiennymi. Opis ilościowy sieci, oparty na rozkładach prawdopodobieństwa warunkowego, przypisanych wierzchołkom, pozwala uzyskać rozkłady prawdopodobieństwa pojedynczych zmiennych czynników środowiska lub rozkład łączny zbioru tych zmiennych. Modelowanie matematyczne z wykorzystaniem sieci bayesowskich umożliwia także rozbudowę diagramu ze zmiennymi środowiskowymi ze względu na występowanie zaburzeń, które zmieniają strukturę i funkcjonowanie badanej populacji. Pozwala to na wprowadzanie nowych informacji w postaci obserwacji i na modyfikacje modelu w warunkach niepewności. Zastosowanie tej metody modelowania do określenia warunków odnawiania populacji ma szczególne znaczenie w sytuacji, gdy tylko część zakresów czynników środowiskowych jest znana (Uusitalo 2007; Newton 2010; Chen, Pollino 2012).

Opracowany model matematyczny – w postaci sieci połączeń – umożliwia określenie związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy badanymi czynnikami, co daje podstawy do wnioskowania na temat warunków środowiskowych niezbędnych do dalszej egzystencji zagrożonej wyginieciem populacji. W procesie modelowania matematycznego, oddziaływanie parametrów środowiskowych na kondycję zagrożonej wyginieciem populacji przedstawiono w postaci sieci wzajemnych powiązań, która jest graficzną reprezentacją analizowanych zmiennych i wzajemnych interakcji pomiędzy nimi (Pollino i in. 2007b). W celu opracowania modelu matematycznego, do sieci bayesowskiej wprowadzono zmienne środowiskowe, takie jak: właściwości gleby, sposób użytkowania terenu, obecność systemu drenażu, wielkość przepływu wody, zagrożenie powodzią, działalność szkodników oraz nawożenie. Modelowane zmienne środowiskowe poddano następnie procesowi dyskretyzacji, w którym, na podstawie literatury oraz wiedzy eksperta, ustalono zakresy wartości dla każdej analizowanej zmiennej. Wprowadzone do sieci bayesowskiej czynniki podzielono na szereg współdziałających ze sobą podsieci, co pozwoliło uzyskać bardziej czytelną prezentację uzyskanych związków przyczynowo-skutkowych (Ryc. 5). Modelowaną sieć połączeń, uwzględniającą wpływ czynników biotycznych i abiotycznych środowiska przyrodniczego na kondycję zagrożonej wyginieciem populacji, poddano następnie procesowi parametryzacji (Pollino i in. 2006), co umożliwiło uzyskanie rozkładów prawdopodobieństw analizowanych zmiennych.

Przeprowadzenie procesu uczenia modelowanej sieci, z zastosowaniem algorytmów matematycznych oraz ocena uzyskanych parametrów na bazie wiedzy eksperta pozwala wnioskować na temat wpływu warunków środowiskowych na kondycję osobników w badanej populacji (Pollino i in. 2007b).



**Rycina 5.** Model sieci bayesowskiej wpływu analizowanych parametrów środowiskowych na kondycję zagrożonej wyginięciem populacji (Pollino i in. 2007b; numer licencji 4462690889774)

**Figure 5.** Bayesian network model of the impact of analyzed environmental parameters on the condition of endangered population (Pollino et al. 2007b; license number 4462690889774)

Opracowany model matematyczny w postaci sieci wzajemnych zależności pomiędzy analizowanymi czynnikami poddano procedurze identyfikacji zagrożeń. Przeprowadzono ją w celu sprawdzenia, jak kształtuje się wielkość wyjściowa modelu na skutek wprowadzania zmian w zakresie parametrów wejściowych sieci (Pollino i in. 2006). Na podstawie analizy wpływu wybranych czynników środowiskowych na badany układ ekologiczny stwierdzono, że istnieje istotna statystycznie zależność pomiędzy kondycją osobników w badanej populacji a obecnością szkodników, typem gleby i zawartością azotanów w glebie. Ustalono także, że warunki wzrostu i rozwoju badanej populacji są ściśle związane ze specyfiką danego regionu.

Opracowana topologia modelu wzajemnych powiązań przyczynowo-skutkowych – w odniesieniu do badanej populacji, która jest w największym stopniu zagrożona, pozwoliła również określić wpływ analizowanych czynników środowiskowych na jej kondycję. Analiza wykazała także, że istnieje istotna statystycznie zależność pomiędzy kondycją osobników w badanej populacji a obecnością szkodników, typem gleby (i jej zdolnością do zatrzymywania wody), zawartością azotanów i fosforanów w glebie, zawartością kationów zasadowych w glebie oraz głębokością zalegania wód gruntowych (Pollino i in. 2007b).

### 3. Podsumowanie i wnioski

Prezentowane metody modelowania matematycznego odgrywają szczególną rolę w badaniach środowiskowych. Wykorzystanie sieci powiązań daje podstawy do podejmowania decyzji zapewniających prawidłowe funkcjonowanie naturalnego układu ekologicznego w warunkach występowania zaburzeń.

#### Podziękowania

Badania sfinansowano ze środków na naukę MNiSW w ramach pracy nr S/WBiIŚ/5/2016.

#### Literatura

- Aguilera P. A., Fernández A., Fernandez R., Rumi R., Salmeron A. 2011. Bayesian networks in environmental modelling. *Environ. Model. Softw.*, 26(12): 1376–1388.
- Aloy P., Russell R. B. 2004. Taking the mystery out of biological networks. *European Molecular Biology Organization Reports*, 5: 349–350.
- Attorre F., Fortunato C., Martellos S. 2013. Botanical information in the Italian Biodiversity Network: One year of data aggregation and future perspectives. *Plant Biosyst.*, 147(4): 1101–1103.
- Beissinger S. R., McCullough D. R. (eds.) 2002. *Population viability analysis*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Chandra R., Omlin C. W. 2007. Knowledge Discovery using Artificial Neural Networks for a Conservation Biology Domain. *International Conference on Data Mining*, Las Vegas, 221–227.
- Chen S., Pollino C. 2012. Good practice in Bayesian network modelling. *Environ. Model. Softw.*, 37: 134–145.



- Costanza R., Voinov A. A. 2001. Modeling ecological and economic systems with STELLA: Part III. *Ecol. Model.*, 143: 1–7.
- Dambacher J. M., Li H. W., Rossignol P. A. 2003. Qualitative predictions in model ecosystems. *Ecol. Model.*, 161: 79–93.
- Drużdżel M. 2005. Wprowadzenie do Sieci Bayesa. *Software Developer's Journal*.
- Fang Y., Mauzerall D. L., Liu J., Fiore A. M., Horowitz L. W. 2013. Impacts of 21<sup>st</sup> century climate change on global air pollution-related premature mortality. *Climatic Change*, 121(2): 239–253.
- Frank K., Wissel C. 2002. A formula for the mean lifetime of metapopulations in heterogeneous landscapes. *The American Naturalist*, 159: 530–552.
- Green J. L., Hastings A., Arzberger P., Ayala F. J., Cottingham K. L., Cuddington K., Davis F., Dunne J. A., Fortin M. J., Gerber L., Neubert M. 2005. Complexity in ecology and conservation: mathematical, statistical, and computational challenges. *BioScience*, 55: 501–510.
- Hannon B., Ruth M. 1997. *Modeling dynamic biological systems*. Springer, New York.
- Jensen F. V. 2001. *Bayesian Networks and Decision Graphs*. Springer, New York.
- Jensen M., Reynolds K., Langner U., Hart M. 2009. Application of Logic and Decision Models in Sustainable Ecosystem Management. [In:] *Proceedings of the 42nd Hawaii International Conference on System Sciences*. Waikoloa, Hawaii.
- Johnston D. 1994. *Getting Started With STELLA II: A Hands-On Experience*. High Performance Systems Inc., Hanover.
- Jordán F. 2001. Ecosystem flow networks and community control. [In:] *Ecosystems and Sustainable Development III. Advances in Ecological Sciences*. WIT Press, Southampton, 771–780.
- Jordán F., Scheuring I. 2004. Network ecology: topological constraints on ecosystems dynamics. *Phys. Life Rev.*, 1: 139–172.
- Leslie H., Ruckelshaus M., Ball I. R., Andelman S., Possingham H. P. 2003. Using siting algorithms in the design of marine reserve networks. *Ecol. Appl.*, 13: 185–198.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2013. Stan zachowania i zagrożenie populacji *Pulsatilla patens* (L.) Mill. pod wpływem zmiennych warunków środowiska przyrodniczego w Puszczy Knyszyńskiej. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.) *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*. Wyd. PTB, Białystok, 143–154.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2014. Mathematical modelling of the influence of air temperature on the conservation status and threat of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. population in the Knyszyńska Forest. *Episteme*, 22: 173–179.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2015. Modelowanie matematyczne w ocenie stanu zachowania populacji zagrożonych gatunków roślin. [W:] Kraiński K., Kraińska A. (red.) *Interdyscyplinarność jako droga rozwoju nauki*. Fundacja Hutena, Elbląg, 87–100.

- Marín J. M., Díez R. M., Insua D. R. 2003. Bayesian methods in plant conservation biology. *Biol. Conserv.*, 113: 379–387.
- Morris W. F., Doak D. F. 2002. *Quantitative conservation biology: theory and practice of population viability analysis*. Sinauer Associates, USA.
- Newton A. C., Stewart G. B., Díaz A., Golicher D., Pullin A. S. 2007. Bayesian belief networks as a tool for evidence-based conservation management. *J. Nat. Conserv.*, 15: 144–160.
- Newton A. C. 2010. Use of Bayesian network for red listing under uncertainty. *Environ. Model. Softw.*, 25: 15–23.
- Oowski S. 2000. *Sieci neuronowe do przetwarzania informacji*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Parviainen M., Luoto M., Heikkinen R. K. 2009. The role of local and landscape level productivity in modelling of boreal plant species richness. *Ecol. Model.*, 220: 2690–2701.
- Pollino C. A., Woodberry O., Nicholson A. E., Korb K. B., Hart B. T. 2006. Parameterisation and evaluation of a Bayesian network for use in an ecological risk assessment. *Environ. Model. Softw.*, 22(8): 1140–1152.
- Pollino C. A., Woodberry O., Nicholson A., Korb K., Hart B. T. 2007a. Parameterisation and evaluation of a Bayesian network for use in an ecological risk assessment. *Environ. Model. Softw.*, 22: 1140–1152.
- Pollino C. A., White A. K., Hart B. T. 2007b. Examination of conflicts and improved strategies for the management of an endangered Eucalypt species using Bayesian network. *Ecol. Model.*, 201: 37–59.
- Pourret O., Naim P., Marcot B. 2008. *Bayesian Networks. A Practical Guide to Applications*. Wiley, USA.
- Proulx S. R., Promislow D. E. L., Phillips P. C. 2005. Network thinking in ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.*, 20: 345–353.
- Reynolds K. M. 2005. Integrated decision support for sustainable forest management in the United States: Fact or fiction? *Comput. Electron. Agr.*, 49: 6–23.
- Rooney T. P. 2001. Deer impacts on forest ecosystems: a North American perspective. *Forestry*, 74: 201–208.
- Sima J. 1995. Neural expert systems. *Neural Networks*, 8(2): 261–271.
- Tadeusiewicz R. 1993. *Sieci neuronowe*. Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa.
- Tadeusiewicz R., Lula P. 2003. *Sieci neuronowe*. StatSoft Polska, Kraków.
- Uusitalo L. 2007. Advantages and challenges of Bayesian networks in environmental modelling. *Ecol. Model.*, 203: 312–318.



# 4 Cryopreservation of plant seeds of Western Ukraine natural and introduced flora. Comparative analysis of obtained data

Emma **Arapetyan**

Botanical Garden of Ivan Franko Lviv National University  
44 Cheremshyny Street, 79014 Lviv, Ukraine

e-mail: emarapetyan@gmail.com

**Abstract:** The study reports some experimental results on conservation of the seeds of herbaceous and coniferous species from different plant families, representing the natural and introduced flora of Western Ukraine, in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . All experimental data for the seeds of investigated species showed their high tolerance to storage conditions. With the help of physical, biochemical and genetic methods, the preservation of the seeds viability has been confirmed. The results have demonstrated that the seeds of investigated species can be divided on the basis of their germination after the storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  into four groups: the first group included the experimental species for which the seed germination percentage was the same as for the control variants, the second group included the species whose seed germination percentage was higher than that of the control one and the third group – the species whose seed germination percentage was lower than that of the control one. The fourth group included the species for which the storage of the seeds in liquid nitrogen stimulated their germination, at the same time the control variant had zero germination.

**Keywords:** cryopreservation; liquid nitrogen; seeds viability; chromosomes, Western Ukraine

## 1. Introduction

International documents on environmental protection pay special attention to active protection of flora gene pool and, particularly, of the local flora. Preservation of plant genetic resources has been of main objectives in scientific investigations (The Convention on Biological Diversity 2010; *European botanic gardens in the decade on biodiversity 2015*). Preservation of plant species of native flora is important for several reasons. The main of them is the destruction of natural vegetation caused by human activity and by climatic changes observed over the last decade (Botanic Gardens in the Age of Climate Change 2009). In addition, the need to preserve natural flora is related to the fact that natural flora species are donors of genetic information for new kinds of crops (Mosyakin, Korotchenko 2012).

The preservation of wild plant diversity is based on their storage *in situ* and *ex situ* conditions. The international vision of flora preservation (preferably regional flora) is based on the long-term conservation in artificial conditions (Botanic gardens in society: visions for the future 2017). The plants preservation *ex situ* is realized by botanical gardens, mainly in the form of living collections (The new challenges and collaboration tasks for botanic gardens from the Baltic Sea Region 2016). Such an approach has several weaknesses, including the following:

- the areas of botanical gardens are not sufficient to conserve a growing number of plants that are included into the Red Book;
- it is physically impossible for the collections to include the number of 500 samples according to the requirements of genetic variability preservation of species;
- living collections are constantly under the negative influence of biotic and abiotic conditions, especially at in the conditions of changing climate.

Recently, the strategy of plant gene pool preservation has been cardinally changed. From the point of view of future research, seed storage is the best approach to *ex situ* plant conservation of plant species. Seeds keep all the information on the genotype that has accumulated during the whole period of species evolution, which is the main advantage of the preservation of genetic material in the form of seeds. Now seeds have become the main object of investigation for long-term preservation of plant genetic information (Seed science in the 21st century 2011). The systematic collection and long-term preservation of seeds started only in the 20<sup>th</sup> century. The plant seeds, collected from the natural places of growth and living collections at botanical gardens all around the world, were kept, as a rule, in laboratories at room temperature. These conditions (in particular laboratory temperature, moisture content and access to oxygen) have negative impact on seeds germi-

nation and lead to their mutation and viability destruction. Thus, the period of seed storage in laboratory conditions is limited. This fact prompted the search for methods of long term preservation of the ability of seeds to germinate in cultural conditions. One of the propositions of long-term seed storage is to keep the seeds in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  which is called cryopreservation. The cryopreservation technique has been a breakthrough as compared to traditional methods such as living collections. This method is adequate to solve the problem of long-term conservation of plant material with preservation of plant genetic information without any negative changes in their biological characteristics.

For *ex situ* conservation, seeds are the most convenient part of plants to preserve. The preservation of the ability of seeds to germinate is the main aim of long-term seed conservation. This technique has several important advantages compared to other traditional plant conservation methods. The main motivations for its use are: a) long-term conservation of plant material without genetic information destruction; b) preservation of seed germination and morphogenetic potentials; c) the number of seeds stored meets the requirements of conservation of genetic diversity of species (more than 500 samples); d) there is no process of mutation, which is noted during the storage of seeds at room temperature; e) there is no genetic drift, which is noted in the subculture of seeds stored under other temperatures; f) the negative impact of environmental conditions (of abiotic and biotic factors) is eliminated ; g) the control over storage conditions is easy; h) the method is ecologically clean, etc.

Long-term preservation of plant material under ultralow temperature with retaining its viability and genetic integrity has become the main method of plant conservation (Reed 2008; Mikula 2013). Successful cryopreservation needs to be based on the establishment protocols for each particular species. The main practical side of the seed cryopreservation research is the regime selection of conservation and re-conservation of plant material depending on the species.

## 2. Study area

The conservation of native plant biodiversity is a priority for Ukrainian botanical gardens. Over the last few years, seed cryopreservation has been developing at the Ivan Franko National University of Lviv. This study presents the results of seed cryoconservation of investigated species that were grown in one climatic region. The aim of the current research was to analyze the experimental data which were obtained for the cryopreserved seeds. The study was has been performed for the

seeds of wild rare or disappearing plant species from the flora growing in the Western Ukraine and for the introduced plants growing in the botanical garden.

### 3. Methods

The research methods were standard and included the following stages. The seeds of control variant were kept in the laboratory conditions. The cryotubes (plastic Eppendorf or paper tubes) with three seed replications of 50 seeds without any pretreatment were preserved in a Dewar vessel with liquid nitrogen under the temperature  $-196^{\circ}\text{C}$  for one or six months in “The cryoconservation scientific-technical centre of low temperature studies” of Lviv University. Then the tubes with cryopreserved seeds were removed using slowing warming under ambient laboratory conditions. Then, the thawing seeds as the seeds of control variant were planted into germination using Petri dishes with one sheet filter paper moistened with 7-10 ml water or sown in the peat leaves mixed soil under conditions at  $23^{\circ}\text{C}$ , 16:8 hours light:dark. The time of initial germination was determined. Testing was continued until it was obvious that no further germination could occur. Based on these data, survival of seeds was estimated as the percentage of seeds that germinated after freezing and thawing in compare with control seeds. The growth and development of the germinated seeds was described according Wellington’s method (Wellington 1972).

Seed tests were performed by a few methods. Biological (biochemical, genetic, microscopy), physical and statistical methods were used for seed characterization after their cryoconservation in liquid nitrogen. Statistical analysis included a) the analysis of variance, which was applied as the Student test at a significance level of  $P < 0.05$ , b) Pearson’s test  $\chi^2$  to assess the impact of temperature conditions on seed germination. Biochemical analysis included the estimation of photosynthetic pigments and anthocyan contents in seedlings. Chlorophyll and anthocyan were identified on the basis of their relevant absorption spectra. Genetic analysis involved ana-telophase analysis in the chromosomes of root meristem seedlings that were fixed using fixative Clark (ethanol and glacial acid 3:1). Squashed preparations were stained by acetoorseyin and were observed using the “Mikomed” microscope with an increase of  $10 \times 90$ . The structure analyses of the surface morphology of the seeds was analyzed using REMMA-102-02 type scanning electron microscopy (SELMU-Ukraine).

Seeds from different families – *Alliaceae* (*Allium cepa* L.), *Asteraceae* (*Aster alpinus* L., *Centaurea carpatica* (Porc.) Porc., *Centaurea kotschyana* Heuff., *Doroni-*

*cum carpaticum* (Griseb. et Schenk) Nym.), *Brassicaceae* (*Alyssum calycocarpum* Rupr., *Alyssum gmelinii* Jord., *Berteroa incana* (L.) DC), *Caryophyllaceae* (*Agrostemma githago* L., *Dianthus deltoides* L., *Dianthus gratianopolitanus* Vill., *Heliopsis carpaticum* (Zapal.) Klok.), *Melandrium album* (Mill.) Garcke, *Silene dubia* Herbich.), *Cistaceae* (*Helianthemum orientale* (Grosser) Juz. et Pozd.), *Cyperaceae* (*Cladium mariscus* (L.) Pohl), *Ericaceae* (*Rhododendron luteum* Sweet.), *Fabaceae* (*Anthyllis biebersteiniana* Popl.), *Gentianaceae* (*Gentiana acaulis* L.), *Papaveraceae* (*Glaucium flavum* Gnatz.), *Pinaceae* (*Pinus korainensis* Siebold ex Zucc., *Pinus mugo* Turra, *Pinus peuce* Griseb., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere), *Taxaceae* (*Taxus baccata* L.), *Taxodiaceae* (*Metasequoia glyptostroboides* Hu & W.C.Cheng, *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) J. Buchholz) were the objects of investigation.

#### 4. Results and Discussion

The obtained results have demonstrated that the seeds of the investigated species can be fast frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$  without the loss of their viability, and their germination capacity is saved. These results apply to seeds from the wild and introduced species. The use of various methods allows us to conclude the absence of a negative effect of storage conditions in liquid nitrogen on the biological characteristics of seeds. The absorption spectra of anthocyan of buckwheat (*Fagopyrum*) seeds were similar for both cryopreserved and uncryopreserved seeds. Genetic analysis of more than 300 ana-telophases as in the control as in preserved seeds allowed detecting normal chromosomes divergence in root meristem cells of *Allium cepa* after the impact of low temperature. Among the visible chromosomal aberrations, standard types were detected and was regulated on a spontaneous level (Arapetyan et al. 2014). No morphological variation of the surface morphology was detected between uncryopreserved seeds (control) and cryopreserved ones (Arapetyan et al. 2014). The results obtained in this study confirm that as has been shown for *Apium graveolens* (celery) coat of seeds (Gonzalez-Benito et al 1995).

The preservation of viability of seeds stored in liquid nitrogen requires qualitative packaging. The use of paper packaging in our experiments for storing seeds in liquid nitrogen showed that the final seed germination as the sum of five replications did not display any difference between the germinated *Allium cepa* seeds which were packed in paper tubes or Eppendorf tubes and was not significantly different from the control ones (Arapetyan et al. 2014). The cryopreserved seeds in



paper tubes demonstrated the same normal growth and development of seedlings as the uncryopreserved ones both in Petri dishes and soil conditions. Comparative analysis of the Pearson's criterion also confirmed the absence of low temperature influence on seed germination as compared to the control one. Microscopic analysis demonstrated no morphological differences in the surface morphology of coat seeds between uncryopreserved seeds (control) and cryopreserved ones in paper or Eppendorf tubes. Thus a complex approach with the use of different methods such as statistical analysis (Student and Pearson's tests), biochemical, genetic analyses, and structural analysis of the surface morphology of seed coat by scanning electron microscopy suggests that tubes made of paper can be used for storage of investigated seeds in liquid nitrogen.

Seed germination is the main criterion determining the effect of storage conditions on the viability of seeds. The obtained data show that germination of the experimental seeds after their storage in liquid nitrogen depended on the species and could increase or decrease compared with the control variant. Our previous research (Arapetyan et al. 2013) in which we reported the analysis of accumulated experimental data on the germination percentage of seeds after cryoconservation under -196°C with the use of Student's test, allowed us to establish that, according to this criterion, plants in our experiments can be divided into three groups in comparison with the control variant that agrees well with literature data (Barbour et al. 2014). The difference in the seed germination percentage between the germination after cryopreservation treatment and unfrozen seeds was insignificant and statistically unreliable for *Alyssum calycocarpum* Rupr., *Anthyllis biebersteiniana* Popl., *Aster alpinus* L., *Centaurea carpatica* (Porc.) Porc., *Centaurea kotschyana* Heuff., *Dianthus gratianopolitanus* Vill, *Glaucium flavum* Gnatz, *Helianthemum orientale* (Grosser) Juz. et Pozd., *Melandrium album* (Mill.) Garcke, *Metasequoia glyptostroboides* Hu & W.C.Cheng, *Rhododendron luteum* Sweet (Tab. 1).

Seed germination percentage after liquid nitrogen storage increased for *Agrostemma githago* L., *Alyssum gmelinii* Jord., *Berteroa incana* (L.) DC, *Pinus mugo* Turra, *Silene dubia* Herbich., *Taxus baccata* L., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere (Tab. 2).

**Table 1.** Germination of seed after cryoconservation

Object	Germination [%]	
	Control	Liquid nitrogen
<i>Alyssum calycocarpum</i>	21,4	18,7
<i>Anthyllis biebersteiniana</i>	9,8	11,3
<i>Aster alpinus</i>	22,0	27,5
<i>Centaurea carpatica</i>	23,6	22,1
<i>Centaurea kotschyana</i>	12,0	11,0
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	88,7	92,0
<i>Helianthemum orientale</i>	20,3	17,4
<i>Melandrium album</i>	27,0	29,0
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	1,7	1,7
<i>Rhododendron luteum</i>	63,2	66,0

**Table 2.** Germination of seed after cryoconservation

Object	Germination [%]	
	Control	Liquid nitrogen
<i>Agrostemma githago</i>	28,0	56,0
<i>Alyssum gmelinii</i>	20,0	40,0
<i>Berteroa incana</i>	20,0	100,0
<i>Pinus mugo</i>	7,0	11,0
<i>Taxus baccata</i>	3,0	8,0
<i>Tsuga canadensis</i>	9,0	14,0

**Table 3.** Germination of seed after cryoconservation

Object	Germination [%]	
	Control	Liquid nitrogen
<i>Cladium mariscus</i>	8,6	4,2
<i>Dianthus deltoids</i>	86,7	75,3
<i>Gentiana acaulis</i>	7,0	4,0
<i>Pinus peuce</i>	16,0	1,0
<i>Pinus koraiensis</i>	9,0	1,0
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	7,0	1,0

Seed germination after liquid nitrogen storage decreased for *Cladium mariscus* (L.) Pohl, *Dianthus deltoides* L., *Gentiana acaulis* L., *Pinus peuce* Griseb., *Pinus koraiensis* Siebold. ex Zucc., *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) J. Buchholz (Tab. 3).

The accumulation of experimental data in recent years has allowed us to single out the fourth group of plants. The storage of seeds of these species (*Doronicum carpathicum* (Griseb. et Schenk) Nym. (13%), *Heliosperma carpathicum* (Zapal.) Klok.) (39%) in liquid nitrogen stimulated their germination, in contrast to the seeds of the control variant, which, after being kept in laboratory, lost their ability to germination (Arapetyan, Usatenko 2013).

The research of cryopreservation for native plant seeds is limited (Touchell, Dixon 1993; Mandel Civatti et al. 2014). As Kellerer (2007) wrote “material of a wild species, *A. obliquum* had to be included at the end of a research project without special preparation in order to rescue at least a part of the material”. We have demonstrated some research results of cryogenic conservation at -196°C for plant seeds which are present in the flora of Western Ukraine and introduced Crimean flora (Arapetyan 2013). The resistance to storage in liquid nitrogen has been discovered for seeds of herbaceous and conifer species from a different plant family. All experimental data for the seeds of investigated species showed their high tolerance to storage conditions. They do not lose their germination ability after cryoconservation. Experimental seeds require no special preparation and the cryoprotective substances for storage. It is shown that the conservation of seeds is possible in Eppendorf and paper tubes. The latter are very convenient for large seeds, like those of coniferous plants. In our experiments, the program of seed conservation is simple, that is, the tubes with seeds were immersed directly into liquid nitrogen. We assumed that such an approach is possible for seeds with low content of moisture and starch, which is typical for investigated seeds of natural flora. This indicates that seedlings derived from the seeds treated by -196°C fit the standards (radicles, hypocotyls, cotyledons) of the International Rules for Seed Testing (Wellington 1972). All germs of cryopreserved seeds had normal growth and development in comparison with control ones and derived into normal plantlets. They were planted into the open soil on the territory of the of the Botanical Garden. Normal growth, development and reproduction in both groups has been noted (Arapetyan, Usatenko 2012). In conclusion, the implementation of the modern method of preservation of plant genetic resources, used for the first time for seeds of the investigated plant species growing on the territory of Western Ukraine has shown that, currently, cryopreservation can be a main method for the long-term seed conservation of these objects.

## Acknowledgments

The author would like to thank Dr Grażyna Łaska Associate Professor for the opportunity to discuss the material presented in this paper at the International Conference “From cell to ecosystem – interdisciplinary study of genetic, pharmacological and biological diversity”. Białystok, Poland, July 9–11, 2017.

## References

- Arapetyan E. R. 2013. Conservation of seeds of the Crimean species *Alyssum calycocarpum* Rupr. (*Brassicaceae*) and *Anthyllis biebersteiniana* Popl. (*Fabaceae*) in liquid nitrogen (-196°C). *Ukr. Bot. J.*, 70(6): 747–750.
- Arapetyan E. R., Khomyn I.G., Stryamets G.V., Ferents N.M. 2013. Use of cryopreservation for the seed conservation of flora Ukraine. 56 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 24–30 czerwca 2013, Olsztyn: 40.
- Arapetyan E. R., Usatenko Y. 2012. Application of the very low temperatures for the preservation of rare plants' seeds of Ukraine. *Proceeding of the 12<sup>th</sup> IIR International Conference*, Sep 10–14 2012, Dresden: 150–153.
- Arapetyan E. R., Usatenko Y. 2013. Seed cryopreservation of sporadically distributed herbaceous plants flora of Ukraine. *Visnyk of the Lviv University, Biology*, 62: 339–343.
- Arapetyan E. R., Usatenko Y., Bodnar L., Serkiz R. 2014. Seed conservation under -196°C in liquid nitrogen. The use of paper tubes for seed cryopreservation. *Proceeding of the 13<sup>th</sup> IIR International Conference*, Apr 7–11 2014, Prague: 314–317.
- Barbour J., Vankus V., Johnson G. 2014. Effect of Liquid Nitrogen Storage on Seed Germination of 51 Tree Species. USDA Forest Service, National Tree Seed Laboratory, [www.slideserve.com](http://www.slideserve.com).
- Botanic gardens in society: visions for the future*. 6<sup>th</sup> Global Botanic Gardens Congress, June 26–30 2017, Geneva, <http://www.ecaf.org>.
- Botanic Gardens in the Age of Climate Change*. Fifth European Botanic Gardens Congress EuroGard, June 8–12 2009, Helsinki, [www.luomus.fi/EuroGard](http://www.luomus.fi/EuroGard) V.
- European botanic gardens in the decade on biodiversity – challenges and responsibilities in the countdown to 2020*. The Seventh European Botanic Gardens Congress EuroGard VII, July 6–10 2015, Paris, <http://www.ecaf.org>.993.
- Gonzalez-Benito M. E., Iriando J. M., Pita J. M., Perez-Garcia F. 1995. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. *Annals of Botany*, 75: 1–4.
- Kellerer J. 2007. Introducing cryopreservation for plant germplasm preservation in Germany. *CryoPlanet*, 1<sup>st</sup> Meeting of Working Group 2, May 10–12, 2007, Florence, Abstract Book: 40–41.

- Mandel Civatti L., Nazaré Guimarães Marchi M., Torres-Silva G., Geraldo Aquino de Assis J., Cortizo Bellintani M. 2014. Cryoconservation of plant germplasm native to Brazil. *African J. Biotechn.*, 13(38): 3847–3853.
- Mikula A. 2013. Practical face of plant cryopreservation. 56 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 24–30 czerwca 2013, Olsztyn: 113–114.
- Mosyakin S. L., Korotchenko I. A. 2012. Crop wild relatives in the red data book Ukraine: representation and prospects of protection. Proceeding of 11 International Conference “The Plant Kingdom in the Red Data Book of Ukraine: Implementing the Global Strategy for Plant Conservation”, October 9–12 2012, Uman: 28–31.
- Reed B. 2008. Cryopreservation – Practical Consideration. [In:] Reed B. (ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. USDA-ARS National Clonal Repository, Corvallis, OR, USA: 3–13, [www.springer.com](http://www.springer.com).
- Seed science in the 21<sup>st</sup> century*. Tenth International Conference on Seed Science, April 10-15 2011, Costa du Sauipe, Bahia, Brazil, <http://www.ecaf.org>.
- The Convention on Biological Diversity*. 2010. The tenth meeting of the Conference of the Parties, October 18-29 2010, Nagoya, Aichi Prefecture, Japan, <http://www.ecaf.org>.
- The new challenges and collaboration tasks for botanic gardens from the Baltic Sea Region*. 2016. The 9<sup>th</sup> International meeting and conference of Botanic Gardens network from the Baltic Sea region, October 5-8 2016; Przelewiec, Poland, <http://ogrodprzelewiec.pl/pliki/pliki/mat-konf-str.pdf>.
- Touchell D. H., Dixon K. W. 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. *Biodiversity & Conservation*, 2(6): 594–602.
- Wellington P. S. 1972. *Handbook for seedling evaluation*. Moscow, Kolos.

## 5 Trochę chłodu dla wigoru – o przerywaniu spoczynku nasion w wyniku zabiegu stratyfikacji

Katarzyna **Ciąćka** / Honorata **Kiljanek** / Paweł **Staszek**  
Urszula **Krasuska** / Agnieszka **Gniazdowska**

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: katarzyna\_ciaccka@sggw.pl

**Streszczenie:** Nasiona warunkują utrzymanie ciągłości gatunku, decydują o bioróżnorodności i umożliwiają rozprzestrzenianie się roślin. Większość nasion nie kiełkuje zaraz po zakończeniu embriogenezy ze względu na to, że obarczone są spoczynkiem. Spoczynek nasion wynika z czynników środowiskowych, ale ma także przyczyny endogenne. Jednym ze sposobów usuwania spoczynku jest stosowanie zabiegu stratyfikacji, który polega najczęściej na poddaniu nasion imbibicji przy ograniczonym dostępie wody w niskiej (chłodowej) temperaturze. W niniejszej pracy omówiono niektóre aspekty ustępowania spoczynku nasion w warunkach stratyfikacji.

**Słowa kluczowe:** hormony roślinne, kiełkowanie nasion, reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS)

# 5 A bit of coolness for vigor – about the breaking of seed dormancy by stratification

Katarzyna **Ciąćka** / Honorata **Kiljanek** / Paweł **Staszek**  
Urszula **Krasuska** / Agnieszka **Gniazdowska**

Department of Plant Physiology, Faculty of Agriculture and Biology  
Warsaw University of Life Sciences-SGGW  
159, Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

e-mail: katarzyna\_ciaccka@sggw.pl

**Abstract:** Seeds determine the continuity of the species, have impact on biodiversity and allow the world spread of plants. Most of the seeds do not germinate immediately after embryogenesis, because they are dormant. The dormancy of seeds results from external environmental factors, but is also due to endogenous agents. One of the methods of dormancy breaking is the use of stratification. During stratification seeds are imbibed with limited moisture in low temperature. This paper discusses some aspects of dormancy breaking by stratification.

**Keywords:** phytohormones, seed germination, reactive nitrogen species-RNS, reactive oxygen species-ROS

## 1. Wstęp

Nasiona pełnią ważną rolę w zachowaniu bioróżnorodności gatunków, gdyż zapewniają rozprzestrzenianie się roślin. Powstanie nasion jest ostatnim etapem fazy generatywnej roślin i warunkuje utrzymanie ciągłości gatunku. Nasiona składają się z zarodka, tkanki magazynującej substancje zapasowe oraz okrywy nasiennej (łupiny nasiennej). Obecność okrywy nasiennej oraz niska zawartość wody – znacznie ograniczająca aktywność metaboliczną zarodka zapewnia przetrwanie nasion w niekorzystnych warunkach środowiska. Zgromadzone w nasionach substancje zapasowe odgrywają istotną rolę w czasie kiełkowania, a następnie podczas wzrostu, zanim rozwinię się sprawny aparat fotosyntetyczny młodej siewki. Kiełkowanie nasion jest fazą w ontogenezie rośliny, która następuje po zakończeniu embriogenezy, tj. po utworzeniu zarodka, i poprzedza fazę wzrostu wegetatywnego. Zgodnie z fizjologiczną definicją, kiełkowanie jest to zespół procesów zachodzących w nasionach, których wynikiem jest aktywacja zarodka. Kiełkowanie rozpoczyna się inicjacją określonych procesów fizycznych i metabolicznych, a kończy się, gdy rozpoczyna się wzrost korzonka zarodkowego. Praktycy (rolnicy i ogrodnicy) zazwyczaj przyjmują, że kiełkowanie kończy się wschodami, czyli powstaniem prawidłowo wykształconych, zdrowych siewek. Niekiedy uważa się, że zakończenie kiełkowania jest równoznaczne z powstaniem samożywej (fotosyntetyzującej) rośliny. W niniejszej pracy, omawiając spoczynek i kiełkowanie nasion, posłużono się fizjologiczną definicją kiełkowania, określającą je jako fazę rozwojową, w której nie występuje wzrost, a istotą jest przygotowanie nasion do inicjacji wzrostu siewek.

## 2. Rodzaje spoczynku nasion

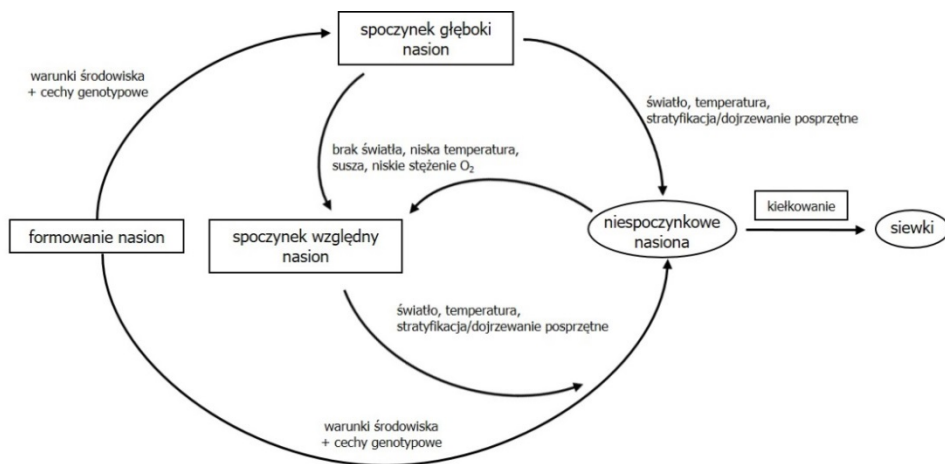
Często po embriogenezie, a jeszcze przed kiełkowaniem, nasiona przechodzą okres spoczynku. Spoczynek nasion jest stanem, w którym zahamowany jest wzrost i rozwój, przemiany metaboliczne, a także większość procesów fizjologicznych zarodka. Jest on wynikiem działania zespołu czynników (barier) utrudniających lub uniemożliwiających kiełkowanie, i pozwala nasionom przetrwać warunki środowiska niekorzystne dla wzrostu i rozwoju siewki (Baskin, Baskin 2004; Finkelstein i in. 2008; Angelovcici i in. 2010; Graeber i in. 2012). Zapadanie w stan spoczynku jest cechą przystosowawczą, utrwaloną dziedzicznie i dotyczy nasion większości gatunków roślin. W tym znaczeniu spoczynek rozpatrywany jest jako przejściowa dysfunkcja dojrzałych, w pełni żywotnych nasion, których kiełkowanie nastąpi, gdy



tylko warunki zewnętrzne ulegną poprawie. Nasiona, funkcjonując jako czujnik środowiskowy, posiadają zdolność reagowania na zmianę warunków zewnętrznych i dostosowywania głębokości spoczynku do panujących warunków środowiska, co wiąże się z regulacją ekspresji genów związanych ze szlakiem biosyntezy i katabolizmu kwasu abscysynowego (ABA) i giberelin (GA) (Footitt i in. 2011). Stąd też nasiona zdolne do kiełkowania w zmieniających się (np. niekorzystnych) warunkach środowiska, mogą powtórnie zapadać w stan spoczynku (Ryc. 1). Do czynników warunkujących ten rodzaj spoczynku, określonego mianem spoczynku wtórnego (względny), należą przede wszystkim: brak światła, niska temperatura, susza, niskie stężenie O<sub>2</sub> (Ryc. 1). Spoczynek względny ustępuje po zapewnieniu nasionom warunków środowiska optymalnych dla kiełkowania.

Innym rodzajem spoczynku jest spoczynek głęboki (wrodzony, właściwy, pierwotny). Wynika on z morfologicznej i/lub fizjologicznej niedojrzałości zarodka. Ten rodzaj spoczynku uniemożliwia kiełkowanie nawet po umieszczeniu nasion w sprzyjających warunkach środowiska (Ryc. 1). Spoczynek pierwotny jako cecha genotypowa, indukowany jest równolegle z akumulacją substancji zapasowych, nabyciem tolerancji na odwodnienie oraz obniżeniem aktywności metabolicznej podczas dojrzewania nasion (Graeber i in. 2012). Głębokość tego typu spoczynku zależy także od warunków środowiska (np. temperatury bądź dostępności w glebie związków mineralnych, np. azotanów), które oddziałują na roślinę mateczną. W celu usunięcia tego rodzaju spoczynku, konieczne jest zastosowanie odpowiednich zabiegów polegających na przechowywaniu nasion w warunkach optymalnej wilgotności i temperatury (stratyfikacja/dojrzewanie posprzędne), bądź dodatkowe traktowanie hormonami roślinnymi, głównie GA (hormonizacja).

Uwzględniając właściwości morfologiczne i fizjologiczne nasion, wyróżniono pięć rodzajów spoczynku (Ryc. 2): spoczynek fizyczny (ang. *physical dormancy* – PY), fizjologiczny (ang. *physiological dormancy* – PD), morfologiczny (ang. *morphological dormancy* – MD) oraz mieszany (ang. *combinational dormancy* – PY+PD) (Baskin, Baskin 2004; Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006). Według nomenklatury stosowanej przez Lewaka (2012), do spoczynku głębokiego zalicza się spoczynek wynikający z niedojrzałości morfologicznej lub fizjologicznej zarodka, natomiast spoczynek fizyczny (PY) można zakwalifikować jako spoczynek względny.



**Rycina 1.** Spoczynek nasion jako etap ontogenezy. Czynniki determinujące głębokość spoczynku nasion i jego ustępowanie (Kermode 2005, zmodyfikowany)

**Figure 1.** Seed dormancy as a stage of ontogenesis. Factors determining seed dormancy and its removal (Kermode 2005, modified)

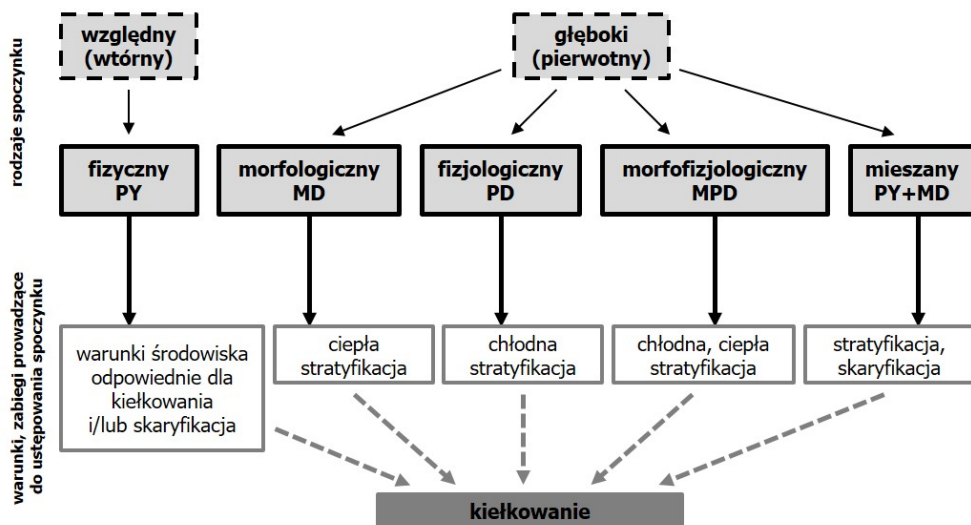
Najbardziej powszechny jest spoczynek fizjologiczny, który może być usunięty w wyniku stratyfikacji (główne stratyfikacji chłodnej), podczas której dochodzi do zmian biochemicznych w zarodku, warunkujących przejście w stan gotowości do kiełkowania (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006). Przykładem rośliny, której nasiona zapadają w stan spoczynku głębokiego jest kminek czarny (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch). Wraz z wydłużaniem okresu chłodnej stratyfikacji (do 120 dni), nasiona kminku czarnego kiełkują coraz lepiej, natomiast słabo – jeżeli w warunkach chłodu i wilgotności znajdują się krócej – poniżej 60 dni (Sharma, Sharma 2010). U niektórych roślin spoczynek nasion ustępuje po zastosowaniu ciepłej i chłodnej stratyfikacji np. u róży (*Rosa x hybrid.*) (Nadeem i in. 2013), bażyny czarnej podgat. obupłciowa (*Empetrum nigrum* subsp. *hermaphroditum* [Hagerup] Böcher) (Baskin i in. 2002). Spoczynek takich nasion klasyfikuje się jako spoczynek wynikający z pośredniej niedojrzałości fizjologicznej zarodka (ang. *intermediate physiological dormancy*) (Baskin, Baskin 2004; Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006). W okresie ciepłej stratyfikacji, następuje u nich usunięcie spoczynku wynikającego z niedojrzałości fizjologicznej zarodka i znacznemu skróceniu ulega czas chłodnej stratyfikacji, którą trzeba zastosować w celu całkowitego ustąpienia spoczynku.

Brak kiełkowania nasion może być także spowodowany niedojrzałością morfologiczną zarodka, wynikającą z zahamowania jego rozwoju przed wejściem w stan spoczynku. Ten rodzaj spoczynku nazywany jest spoczynkiem morfologicznym

(MD). Niedojrzałość morfologiczna zarodka związana jest z jego małymi rozmiarami, a nie z brakiem zróżnicowania w budowie na: liścienie, oś zarodkową, czy część hipokotylową (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006). Takie nasiona nie wymagają specjalnego traktowania, w wyniku którego dochodzi do usunięcia spoczynku, jak w przypadku spoczynku wywołanego niedojrzałością fizjologiczną zarodka. Zabiegiem usuwającym omawiany typ spoczynku jest najczęściej ciepła stratyfikacja. Podczas zabiegu ciepłej stratyfikacji w optymalnych warunkach wilgotności i temperatury, zarodki rosną w nasionach. Przykładem roślin, których nasiona charakteryzuje spoczynek morfologiczny, są wiciokrzew siny (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* (Maxim.) Nakai) (Phartyal i in. 2009) lub seler (*Apium graveolens* L.) (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006).

Spoczynek może być również warunkowany właściwościami strukturalnymi nasion. Obecność okrywy nasiennej bądź bielma może stanowić barierę fizyczną dla rosnącego korzenia zarodkowego, jednocześnie utrudniając przenikanie gazów i wody (spoczynek fizyczny – PY). Skaryfikacja chemiczna lub mechaniczna jest metodą warunkującą przerwanie tego typu spoczynku. Przykładami roślin, których nasiona charakteryzuje ten rodzaj spoczynku są: nostryk (*Melilotus*), kozieradka (*Trigonella*), łubin (*Lupinus*) (Baskin 2003).

Pozostałe dwa rodzaje spoczynku stanowią połączenie wymienionych powyżej, np. spoczynek morfofizjologiczny (MPD) występuje u rutewki (*Thalictrum rochebrunianum* Franch. & Sav.) (Lee i in. 2015) i spoczynek mieszany, będący połączeniem PY oraz PD (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006; Graeber i in. 2012) (Ryc. 2). Spoczynek mieszany (PY+PD) występuje u nasion bodziszka (*Geranium*) (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006), cyclokarii okrągłowocowej (*Cyclocarya paliurus* (Batalin) Iljinsk.) (Fang i in. 2006), galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.) (Rahnama-Ghahfarokhi, Tavakkol-Afshari 2007). Nasiona tych roślin kiełkują po zastosowaniu zarówno zabiegów skaryfikacji, jak i stratyfikacji. Nasiona głogu szypułkowego (*Crataegus pedicellata* Sarg.) natomiast kiełkowały dobrze po zastosowaniu następujących po sobie zabiegów chłodnej i ciepłej stratyfikacji, zakończonych krótkotrwałą skaryfikacją (120 min.) w 96% kwasie siarkowym (Bujarska-Borkowska 2008).



Rycina 2. Rodzaje spoczynku nasion oraz warunki i/lub zabiegi prowadzące do jego ustępowania

Figure 2. Types of seed dormancy and conditions and/or treatments leading to its removal

### 3. Stratyfikacja jako zabieg prowadzący do ustępowania spoczynku

U wielu gatunków roślin spoczynek nasion ustępuje podczas chłodnej stratyfikacji. Zabieg ten jest powszechnie stosowany do przełamania spoczynku nasion gatunków roślin strefy umiarkowanej, szczególnie tych, których nasiona kiełkują w naturalnym środowisku na wiosnę. Polega on na przechowywaniu nasion w wilgotnym piasku lub torfie w warunkach chłodu (0-10°C), przy czym temperatura 5°C jest dla większości nasion optymalna. Przykładem rośliny, której nasiona bezwzględnie wymagają chłodnej stratyfikacji, jest powszechnie występujący w Polsce podagrycznik pospolity (*Aegopodium podagraria* L.) (Vandelook i in. 2009). Listę gatunków występujących w Andach w Chile, których nasiona kiełkują po zastosowaniu chłodnej stratyfikacji, przedstawiono w pracy Cavieres i Sierra-Almeida (2018), w której wskazano również na znaczenie niskiej temperatury i okrywy śnieżnej dla zachowania bioróżnorodności na świecie. U niektórych gatunków roślin chłodna stratyfikacja nie jest skuteczna w przełamaniu spoczynku, jeśli nie jest poprzedzona kilkutygodniowym okresem ciepła (około 15°C). Dotyczy to np. gatunków z rodzaju *Taxus*, *Cephalotaxus*, niektórych *Fraxinus* oraz *Vibur-*

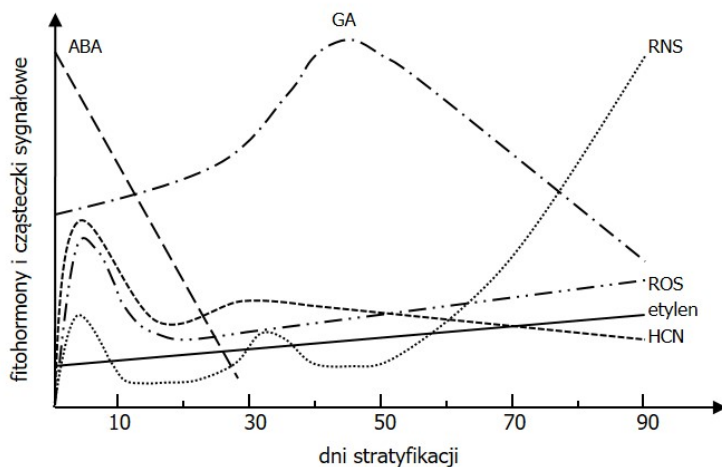
num (Chen i in. 2015). Typowym przykładem takiej rośliny jest styrak japoński (*Styrax japonicus* Siebold et Zucc.), nasiona tego drzewa kiełkują tylko po 60 dniach stratyfikacji w cieple (18°C), po której następuje 80 dni stratyfikacji chłodnej (5,5°C) (Horimoto i in. 2011). Przerwanie spoczynku, w wyniku chłodnej stratyfikacji, zwiększa nie tylko procent kiełkowania nasion i szybkość tego procesu, a także często rozszerza zakres temperatur, w których nasiona kiełkują (Baskin, Baskin 2014). Długość okresu chłodnej stratyfikacji wpływa na ustępowanie spoczynku nasion. Nasiona jaśminu krzewiastego (*Jasminus fruticans* L.), poddane zabiegowi chłodnej stratyfikacji, trwającej 1 miesiąc, kiełkowały w 21%, natomiast po 2 lub 3 miesiącach odpowiednio: w 70% oraz 86% (Pipinis i in. 2009). Co ciekawe, zdecydowanie niższe kiełkowanie nasion tej rośliny obserwowano po stratyfikacji tylko przez 1 miesiąc w warunkach chłodu, co było poprzedzone ciepłą stratyfikacją (25°C) trwającą 1 lub 2 miesiące (Pipinis i in. 2009). Podobny wynik otrzymano analizując kiełkowanie nasion palmy (*Areca triandra* Roxb. Ex Buch-Ham) (Yang i in. 2007). Nasiona tego ozdobnego drzewa wykazują spoczynek związany z obecnością perykarpu, a także spoczynek głęboki wywołany czynnikami fizjologicznymi. Stratyfikowano je w 4°C przez 30, 60, 75 i 120 dni, a testy kiełkowania wykazały, że nasiona stratyfikowane dłużej kiełkowały wcześniej i proces ten kończył się szybciej (Yang i in. 2007). Przełamanie pierwotnego spoczynku podczas stratyfikacji zaobserwowano również dla nasion werbeny lekarskiej (*Verbena officinalis* L.) (Brandel, Schütz 2003). 28-tygodniowa stratyfikacja nasion (w zróżnicowanych temperaturach: 3, 8, 12, 15 i 18°C) była skutecznym zabiegiem przełamującym spoczynek tylko w temperaturze poniżej 12°C, przy czym uzyskiwano coraz lepsze kiełkowanie wraz z przedłużającym się okresem stratyfikacji. Dla nasion brzoskwini zwyczajnej odmiany GF305 (*Prunus persica* (L.) Batsch) wykazano, że jeżeli czas chłodnej stratyfikacji (7°C) był krótszy niż 4 tygodnie, to rośliny rozwijające się z takich nasion charakteryzowały się zredukowanym wzrostem oraz deformacjami liści (Martínez-Gómez, Dicenta 2001). Kiełkowanie nasion brzoskwini rozpoczynało się po 8 tygodniach stratyfikacji, osiągając 50% po 12 tygodniach. Stratyfikacja wpłynęła także korzystnie na wzrost siewek. Przedłużający się do 14 tygodni okres stratyfikacji powodował jednak ograniczenie wzrostu siewek. García-Gucano i in. (2004) zastosowali chłodną stratyfikację trwającą 1-10 tygodni w temperaturze 7°C, a następnie dwutygodniową stratyfikację w cieple (22°C) w celu przełamania spoczynku nasion różnych odmian migdałowca pospolitego (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb). Dla ustąpienia spoczynku, nasiona wczesnych odmian migdałowca wymagały 6 tygodni traktowania chłodem, a nasiona odmian późnych – około 7 tygodni.

Nasiona cisu Maire'a (*Taxus mairei* Lemée & H.Lév.) charakteryzuje głęboki spoczynek. Tylko po zastosowaniu ciepłej stratyfikacji, poprzedzonej 3 miesiącami stratyfikacji chłodnej (5°C), nasiona cisu kiełkowały prawie w 90%. Traktowanie chłodem spowodowało znaczny wzrost rozmiarów zarodka w porównaniu z nasionami, które były poddane jedynie działaniu stratyfikacji w cieple (Chien i in. 1998).

Wyraźny wpływ długości okresu chłodnej stratyfikacji (5-60 dni) i temperatury (0-25°C) na skuteczność usuwania spoczynku wykazano dla nasion winorośli (*Vitis vinifera* x *V. amurensis*) (Wang i in. 2009). Nasiona te wymagały stratyfikacji w temperaturze poniżej 10°C, przy czym najlepszy efekt osiągnęto, gdy zabieg trwał przynajmniej 30 dni.

Tłumacząc mechanizm ustępowania spoczynku w procesie stratyfikacji przyjmuje się, że niska temperatura powoduje zmianę stężenia hormonów roślinnych (głównie kwasu abscysynowego (ABA), giberelin (GA) i etylenu) w nasionach. Niska temperatura stymuluje syntezę GA (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006). Charakterystyczne dla ustępowania spoczynku zmiany stężenia GA i ABA obserwuje się np. w trakcie stratyfikacji nasion jabłoni (Lewak 2011). Towarzyszy im nieznaczny wzrost emisji etylenu (Ryc. 3), który powoduje obniżenie wrażliwości komórek zarodka na ABA (Gniazdowska i in. 2010). Analiza transkryptomyczna, przeprowadzona dla nasion czworolistu wielolistnego (*Paris polyphylla* Sm.) (nasiona typu recalcitrant – nie znoszące dehydratacji), pozwoliła na wytypowanie szeregu genów, których ekspresja jest charakterystyczna dla ustępowania spoczynku w warunkach stratyfikacji. Nasiona tej rośliny obciążone są głębokim spoczynkiem morfofizjologicznym (MPD), dla przerwania którego wymagana jest 2-miesięczna stratyfikacja w temperaturze 20°C, po której konieczne są kolejne 2 miesiące chłodu (4°C) (Qi i in. 2013). Wśród zidentyfikowanych genów znalazły się geny kodujące enzymy szlaku biosyntezy/katabolizmu GA, ABA i auksyn, szlaku transdukcji GA, ABA, etylenu, a także brassinosteroidów (Qi i in. 2013).

W czasie trwania chłodnej stratyfikacji nasion dochodzi do zmiany stężenia niskocząsteczkowych molekuł o charakterze sygnałowym. Wykazano, że nasiona jabłoni w niskiej temperaturze uwalniają cyjanowodór (HCN) (Lewak 2011 i cytowane tam prace). Źródłem HCN są zgromadzone w nasionach związki cyjanogenne takie jak amigdalina i prunazyne. Uwalnianie HCN podczas chłodnej stratyfikacji nasion jabłoni przebiega dwufazowo (Ryc. 3). Pierwszy wyrzut HCN następuje około 14. dnia stratyfikacji, a kolejny – o wiele niższy pik emisji tego gazu przypada około 30.-40. dnia zabiegu. HCN jest jednym z kluczowych czynników endogennych odpowiedzialnych za usuwanie spoczynku nasion jabłoni, o czym może świadczyć brak emisji HCN w czasie ciepłej stratyfikacji, która nie przełamuje spoczynku tych nasion.



**Rycina 3.** Zmiany stężenia fitohormonów (ABA, GA, etylenu) oraz cząsteczek sygnałowych (HCN, ROS, RNS) w czasie ustępowaniu spoczynku nasion jabłoni, w warunkach chłodnej stratyfikacji (Lewak 2011; Dębska i in. 2013, zmodyfikowane)

**Figure 3.** Changes in the concentration of phytohormones (ABA, GA, ethylene) and signaling molecules (HCN, ROS, RNS) during the dormancy removal of apple seeds by 3 month long cold stratification treatment (Lewak 2011; Dębska et al. 2013, modified)

Ustępowanie spoczynku nasion w wyniku chłodnej stratyfikacji wymaga także specyficznego przebiegu zmian zawartości reaktywnych form tlenu (ROS) oraz reaktywnych form azotu (RNS). Podczas stratyfikacji chłodnej nasion jabłoni, obserwowano fluktuacje stężenia  $H_2O_2$  w osiach zarodkowych (Ryc. 3). Pierwszy wzrost stężenia  $H_2O_2$  występował po 2 tygodniach stratyfikacji, a następnie nagromadzenie  $H_2O_2$  notowano od 70. dnia procesu, gdy nasiona traciły spoczynek (Dębska i in. 2013). Podobny przebieg zmian zaobserwowano dla tlenu azotu (NO) (Ryc. 3). Zestawienie zmian stężenia  $H_2O_2$ , NO i HCN wskazuje na ściśle współdziałanie tych cząsteczek sygnałowych w regulacji ustępowania spoczynku nasion jabłoni podczas chłodnej stratyfikacji (Dębska i in. 2013). Z kolei, w nasionach poddanych stratyfikacji w cieple ( $25^{\circ}C$ ), które nie kiełkowały, notowano gwałtowny, pojawiający się od początku prowadzenia zabiegu wzrost zawartości  $H_2O_2$ , prowadzący w rezultacie do uszkodzeń komórek i starzenia się nasion (Dębska i in. 2013). Ścisły związek pomiędzy ustępowaniem spoczynku w wyniku stratyfikacji a zawartością  $H_2O_2$  obserwowano także dla nasion innych roślin: granatu właściwego (*Punica granatum* L.) (Shalimu i in. 2016), kminku czarnego (Amoo-ghaie, Ahmadi 2017), siekiernicy (*Hedysarum scoparium* Fisch. & C.A.Mey) (Su i in. 2016). Dla ustąpienia spoczynku nasiona kminku wymagają 15-tygodniowej

chłodnej (5°C) stratyfikacji. Wyraźny wzrost stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) zaobserwowano po 5. tygodniach zabiegu, przy czym gdy eksperyment prowadzono 10 tygodni dłużej, stężenie obu badanych ROS było około 2-krotnie wyższe (Amooaghaie, Ahmadi 2017). Nasiona granatu najlepiej kiełkują po zastosowaniu następujących po sobie okresów ciepłej (2 miesiące) i chłodnej (2 miesiące) stratyfikacji (Shalimu i in. 2016). Wzrost zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tak traktowanych nasionach obserwowany był od 1. tygodnia ciepłej stratyfikacji, następnie utrzymywał się na stałym poziomie i nieznacznie rósł pod koniec chłodnej stratyfikacji. Dostępne dane wskazują, że nagromadzeniu ROS w nasionach, których spoczynek ustępuje podczas stratyfikacji, towarzyszą zmiany zawartości białek utlenionych. W osiach zarodkowych nasion jabłoni przebieg zmian zawartości grup karbonylowych w białkach odzwierciedlał wahania stężenia ROS (Dębska i in. 2013). W nasionach granatu, najwyższą zawartość karbonylowanych białek oznaczono po okresie ciepłej stratyfikacji (Shalimu i in. 2016). Z kolei w nasionach siekiernicy, nagromadzenie grup karbonylowych białek miało miejsce w czasie 10-dniowej chłodnej stratyfikacji (4°C), jednak największą zawartością karbonylowanych białek charakteryzowały się niespoczynkowe nasiona po 2 dniach imbibicji (Su i in. 2016). Shalimu i in. (2016) zaproponowali model opisujący znaczenie ROS i RNS podczas ustępowania spoczynku nasion granatu w warunkach stratyfikacji (ciepła + chłodna). Zakłada on wzrost stężenia ROS i NO oraz peroksydacji lipidów na początku okresu stratyfikacji, przy jednoczesnym uruchomieniu mechanizmów biochemicznych (enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego) utrzymujących stężenie ROS i NO na poziomie warunkującym transdukcję sygnału, ale nieprowadzącym do powstawania uszkodzeń.

Chłodna stratyfikacja jest stosowana od lat jako powszechny zabieg warunkujący ustępowanie spoczynku nasion wielu gatunków roślin, szczególnie z rodziny różowatych. Przemiany biochemiczne związane z metabolizmem substancji zapasowych i regulacji zawartości hormonów roślinnych, zachodzące w nasionach w czasie stratyfikacji, opisano szczegółowo, głównie w odniesieniu do nasion jabłoni (Lewak 2011 i cytowane tam prace). Postęp w zakresie proteomiki i transkryptomiki otworzył nowe możliwości badania regulacji ustępowania spoczynku nasion. Można się zatem spodziewać, że w nadchodzących latach zostanie wypełniona luka w wiedzy dotycząca tego zagadnienia.



## Podziękowania

Praca powstała podczas realizacji projektu OPUS 12 2016/23/B/NZ9/03462, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Autorzy wyrażają podziękowania dr Karolinie Dębskiej za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

## Literatura

- Amooaghaie R., Ahmadi F. 2017. Triangular interplay between ROS, ABA and GA in dormancy alleviation of *Bunium persicum* seeds by cold stratification. *Russ. J. Plant Physiol.*, 64: 588.
- Angelovici R., Galili G., Fernie A. R., Fait A. 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.*, 15: 1360–1385.
- Baskin C. C. 2003. Breaking physical dormancy in seeds – focusing on the lens. *New Phytol.*, 158: 227–238.
- Baskin C. C., Baskin J. M. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, second ed. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Baskin C. C., Zackrisson O., Baskin J. M. 2002. Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (*Empetraceae*), a circumboreal species with a stony endocarp. *Am. J. Bot.*, 89: 486–493.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.*, 14: 1–16.
- Brandel M., Schütz W. 2003. Seasonal dormancy patterns and stratification requirements in seeds of *Verbena officinalis* L. *Basic and Applied Ecology*, 4: 329–37.
- Bujarska-Borkowska B. 2008. Seed dormancy breaking in *Crataegus pedicellata*. *Dendrobiology*, 60: 51–56.
- Cavieres L. A., Sierra-Almeida A. 2018. Assessing the importance of cold-stratification for seed germination in alpine plant species of the High-Andes of central Chile. *Perspect. Plant Ecol. Syst.*, 30: 125–131.
- Chen S. Y., Chou S. H., Tsai C. C., Hsu W. Y., Baskin C. C., Baskin J. M., Chien C. T., Kuo-Huang L. L. 2015. Effects of moist cold stratification on germination, plant growth regulators, metabolites and embryo ultrastructure in seeds of *Acer morrisonense* (*Sapindaceae*). *Plant Physiol.*, 94: 165–173.
- Chien C. T., Kuo-Huang L. L., Lin T. P. 1998. Changes in ultrastructure and abscisic acid level, and response to applied gibberellins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. *Ann. Bot.*, 81: 41–47.
- Dębska K., Krasuska U., Budnicka K., Bogatek R., Gniazdowska A. 2013. Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO production and protein carbonylation level. *J. Plant Physiol.*, 170: 480–488.

- Fang S., Wang J., Wei Z., Zhu Z. 2006. Methods to break dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja. *Scientia Horticulturae*, 110: 305–309.
- Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.*, 171: 501–523.
- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 387–415.
- Footitt S., Douterelo-Soler I., Clay H., Finch-Savage W. E. 2011. Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108: 20236–20241.
- García-Gucano M., Martínez-Gómez P., Dicenta F. 2004. Breaking seed dormancy in almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb). *Scientia Horticulturae*, 99: 363–370.
- Gniazdowska A., Krasuska U., Bogatek R. 2010. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232: 1397–1407.
- Graeber K., Nakabayashi K., Miatton E., Leubner-Metzger G., Soppe W. J. J. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ.*, 35: 1769–1786.
- Horimoto T., Koshioka M., Kubota S., Mander L. N., Hirai N., Ishida N., Suh J. K., Lee A. K., Roh M. S. 2011. Effect of warm and cold stratification on <sup>1</sup>H-NMR profiles, endogenous gibberellins and abscisic acid in *Styrax japonicus* seeds. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 52: 233–239.
- Kermode A. R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *J. Plant Growth Regul.*, 24: 319–344.
- Lee S. Y., Rhie Y. H., Kim K. S. 2015. Non-deep simple morphophysiological dormancy in seeds of *Thalictrum rochebrunianum*, an endemic perennial herb in the Korean Peninsula. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 56: 366.
- Lewak S. 2011. Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: seven decades of research. *Acta Physiol. Plant.*, 33: 1–24.
- Lewak S. 2012. *Spoczynek roślin*. [W:] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 576–586.
- Martínez-Gómez P., Dicenta F. 2001. Mechanism of dormancy in seeds of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. GF305. *Scientia Horticulturae*, 91: 51–58.
- Nadeem M., Riaz A., Younis A., Akond M., Farooq A., Tariq U. 2013. Improved technique for treating seed dormancy to enhance germination in *Rosa x hybrid*. *Turk. J. Bot.*, 37: 521–529.
- Phartyal S. S., Kondo T., Hoshino Y., Baskin C. C., Baskin J. M. 2009. Morphological dormancy in seeds of the autumn-germinating shrub *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx* (*Caprifoliaceae*). *Plant Spec. Biol.*, 24: 20–26.

- Pipinis E., Milios M., Aslanidou M., Mavrokordopoulou O., Smiris P. 2009. The effect of stratification on seed germination of *Jasminus fruticans* L. (*Oleaceae*): A contribution to a better insight on the species germination ecology. *Int. J. Botany*, 5: 181–185.
- Qi J., Zheng N., Zhang B., Sun P., Hu S., Xu W., Ma Q., Zhao T., Zhou L., Qin M., Li X. 2013. Mining genes involved in the stratification of *Paris polyphylla* seeds using high-throughput embryo transcriptome sequencing. *BMC Genomics*, 14: 358.
- Rahnama-Ghahfarokhi A., Tavakkol-Afshari R. 2007. Methods for dormancy breaking and germination of galbanum seeds (*Ferula gummosa*). *Asia J. Plant Sci.*, 6: 611–616.
- Shalimu D., Sun J., Baskin C. C., Baskin J. M., Sun L., Liu Y. 2016. Changes in oxidative patterns during dormancy break by warm and cold stratification in seeds of an edible fruit tree. *AoB Plants*, 8: plw024.
- Sharma R. K., Sharma S. 2010. Effect of cold-stratification on seed physiological aspects of *Bunium persicum*: a threatened medicinal herb of trans-himalaya. *Int. J. Botany*, 6: 151–156.
- Su L., Lan Q., Pritchard H. W., Xue H., Wang X. 2016. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, 109: 406–415.
- Vandelook F., Bolle N., Van Assche J. A. 2009. Morphological and physiological dormancy in seeds of *Aegopodium podagraria* (*Apiaceae*) broken successively during cold stratification. *Seed Sci. Res.*, 19: 115–123.
- Wang W. Q., Song S. Q., Li S. H., Gan Y. Y., Wu J. H., Cheng H. Y. 2009. Quantitative description of the effect of stratification on dormancy release of grape seeds in response to various temperatures and water contents. *J. Exp. Bot.*, 60: 3397–3406.
- Yang Q. H., Ye W. H., Yin X. J. 2007. Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Scientia Horticulturae*, 113: 107–111.

## 6 Use of molecular methods in assessing genetic diversity and biotechnological research

Sergey E. **Dromashko**

Institute of Genetics and Cytology, the National Academy of Sciences of Belarus  
27, Akademicheskaya Street, 220072 Minsk, Belarus

e-mail: S.Dromashko@igc.by

**Abstract:** The article deals with molecular methods applied for assessment of genetic diversity. Genomic registration of microorganisms, plants and animals is becoming increasingly important. The process of determining the genotype of an individual is carried out using a variety of molecular genetic methods/markers. Some commonly used types of genetic markers are: RFLP, SSLP, AFLP, RAPD, VNTR, SSR, SNP, STR, SFP, DA<sub>r</sub>T, RAD, etc. Belarusian researchers have been using these methods for certification of agricultural and wild plants, animals, birds, and fish, as well as for creation of their DNA and cell culture banks. DNA barcoding is a system for fast and accurate species identification that makes ecological system more accessible using a short DNA sequence instead of the whole genome and it is used for eukaryotes. The genetic marker is a short DNA sequence generated from the standard region of a genome. This marker is different for various species like CO1 cytochrome c oxidase 1 for animals, chloroplast maturase K+ribulose-1.5-bisphosphate carboxylate for plants and internal transcribed spacer for fungi. DNA barcoding has many applications in various fields like preservation of natural resources, protection of endangered species, control of agricultural pests, identification of disease vectors, monitoring of water quality, authentication of natural health products, and identification of medicinal plants. The advantage of DNA barcoding also lies in the possibility of species identification at all life stages, fragments/products of organisms, stomach contents, etc. In Belarus, DNA barcoding investigations are carried out at the National Academy of Sciences (the Institute of Genetics and Cytology, the Scientific and Practical Center for Bioresources) and the Belarusian State University.

**Keywords:** Belarusian achievements, DNA barcoding, genetic diversity, genetic markers, plant certification

## 1. Introduction

Genomic registration of microorganisms, plants and animals is becoming increasingly important. Development of methods for genotyping living organisms valuable from ecological, pharmaceutical and/or agricultural points of view is underway. The scale and importance of making DNA certificates is well-illustrated by the fact that many countries have already issued legal acts that regulate this process. Determination of the genotypes of individuals is carried out using a variety of molecular genetic methods, such as PCR – polymerase chain reaction, DNA sequencing, hybridization, DNA microarrays, and the like. The article deals with molecular methods applied for assessment of genetic diversity, in particular, the so-called DNA barcoding. The paper also provides information on the current state of research in the field of genomic biotechnologies in Belarus, formation of molecular genetic certificates for plants, etc.

## 2. Methods for molecular genetic certification

Molecular genetic markers can be divided into two classes:

- a) biochemical markers, which detect variation at the gene product level such as changes in proteins and amino acids;
- b) molecular markers, which detect variation at the DNA level such as nucleotide changes: deletion, duplication, inversion and/or insertion. In the second case, a gene or other fragment of DNA with the known location in a genome is called a DNA marker.

It is a unique nucleotide sequence, occurring in proximity to the gene or locus of interest. Such a marker definition refers to any unique DNA sequence, which can be used in DNA hybridization, PCR or restriction mapping experiments to identify that sequence. This nucleotide sequence can be identified by a range of molecular techniques such as RFLPs, RAPDs, AFLP, SNPs, SCARs, microsatellites, and etc. (the following literature is quoted from original sources).

### 2.1. Markers based on DNA probes

This type of molecular genetic techniques historically appeared first. These methods include:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism). The restriction fragment length polymorphism of DNA fragments can be evaluated in different ways, but the most traditional method is using blot-hybridization (Southern 1975);

- VNTR (variable number tandem repeat) (Jeffreys et al. 1985).

## 2.2. PCR markers

The polymerase chain reaction (PCR) method involves the use of specific primers and the production of discrete DNA products amplifying individual regions of genomic DNA. A large number of related technologies are based on this principle. The DNA markers show a number of advantages, in particular they:

- are highly polymorphic;
- have simple inheritance (often co-dominant);
- occur abundantly throughout the genome;
- are easy and fast to detect;
- exhibit minimum pleiotropic effect.

The process of determining the genotype of an individual is carried out using a variety of molecular genetic methods/markers. Some commonly used types of PCR markers are as follows:

- RAPD (random amplification of polymorphic DNA). The method is based on the amplification of random DNA segments with single primers of an arbitrary nucleotide sequence (Welsh, McClelland 1990; Williams et al. 1990);
- SSR (simple sequence repeats, or microsatellites). Microsatellites are stretches of monotonous repetitions of short (1–5 bp) nucleotide motifs that are distributed across the whole genome in eukaryotes (Tautz, Schlötterer 1994). PCR with flanking primers to a short microsatellite repeat allows detection of markers with codominant inheritance and, accordingly, is convenient for detecting heterozygotes at a given locus;
- ISSR (inter simple sequence repeats). This is a specialized version of the RAPD method, in which the primer consists of a microsatellite sequence (Zietkiewicz et al. 1994);
- AFLP (amplified fragment length polymorphism) which is a combination of RFLP and PCR methods (Vos et al. 1995);
- IRAP (inter retrotransposon amplified polymorphism). It is PCR between primers complementary to the sequences of two long terminal repeats (LTR) of a retrotransposon (Kalendar et al. 1999; Kalendar, Shulman 2006);
- REMAP (retrotransposon microsatellite amplified polymorphism). This method uses PCR between the primer to the retrotransposon LTR fragment and a primer from a nearby simple microsatellite repeat (ISSR primer) (Kalendar et al. 1999; Kalendar, Shulman 2006);

- RBIP (retrotransposon-based insertion polymorphisms). The principle is based on multilocus PCR, which uses the pair of primers flanking the DNA site prior to retrotransposition and the retrotransposon LTR primer that is embedded in this region between the first two primers (Flavell et al. 1998);
- iPBS (inter PBS amplification). This method is based on the use of primers to PBS (tRNA binding site) sequences of retrotransposons (Kalendar et al. 2010).

Thus, SNP markers are of great importance in medical genetics because some SNPs predispose individuals to have a certain disease or trait or react to a drug in a different way (Weiss 1998; Carlson 2008), although they cannot be widely used for genetic certification of plants and animals because of their high cost. Currently, different variants of molecular markers are used for genetic typing; each of them has its advantages and disadvantages. For example, RAPD technology is based on the analysis of amplified polymorphic DNA fragments using single primers with an arbitrary nucleotide sequence. It can be useful when the study of an organism begins, and *a priori* you know nothing about its DNA structure. After that it is possible to use other technologies (microsatellites, ISSR, REMAP, and etc.).

### 3. Directions and results of research in the field of genomic biotechnologies in Belarus

There are examples of genomic identification and certification of agricultural and wild plants, animals, birds, and fish at the Institute of Genetics and Cytology and other research institutions and universities of Belarus (Tab. 1, Tab. 2).

An effective tool for accelerating genome research is the Republican DNA Bank of a Human, Animals, Plants, and Microorganisms established on the initiative of and headed by Professor Alexander V. Kilchevsky. The Council of Ministers of the Republic of Belarus assigned it a status of the National Heritage in 2016. Now, the bank consists of 10165 DNA samples and 4255 biological material samples. Only in 2016, the bank was replenished with 164 samples of plant DNA and 40 DNA samples of rare and endangered plant species from the protected areas.

The development of genetic engineering in Belarus is associated with the name of Professor Nikolai A. Kartel, who started these studies with genetic transformation of agricultural plants in the 1970s. The current level of work on the development of GMO plants is presented in Table 2.

**Table 1.** Results in the field of genomic biotechnologies in Belarus

Organisms	Directions	Results
Plants	Transgenesis DNA labelling	Transgenic plants (potatoes, rape, flax-flax, clover meadow, cranberry) DNA identification of crops (wheat, rye, tomatoes, etc.) Marker associated selection (wheat, rye, triticale, tomatoes, pepper, cabbadge)
Animals	Transgenesis DNA labelling	Transgenic animals (goats) DNA identification of agricultural and wild animals (cow, horse, bison, deer, boar, carp, sturgeon, insects) Marker associated selection (cow, horse, pig, carp)
Humans	DNA labelling	DNA diagnostics, prognosis and monitoring of hereditary diseases (more than 70 genes) DNA testing in sports (more than 20 genes)
Microorganisms	Transgenesis DNA labelling	Transgenic microorganisms (laboratory strains) DNA identification of strains of microorganisms (food and soil strains)
Food	GMO detection	Determination of the presence of genetically modified ingredients in food raw materials and food products (soybean, corn, rice, tomatoes, etc.)

**Table 2.** Research on plant genetic engineering in Belarus

Organisms	Effect	Institution
Potatoes	Resistant to the Y-virus	Scientific and Practical Centre for Potato, Fruit and Vegetable Growing (Samokhvalovich)
Potatoes	Resistant to fungus diseases	Institute of Genetics and Cytology (Minsk), Institute of Biophysics and Cell Engineering (Minsk)
Potatoes	Insect-resistant*	Institute of Genetics and Cytology (Minsk)
Potatoes	Antimicrobial peptides are synthesized	Institute of Biophysics and Cell Engineering (Minsk) Scientific and Practical Centre for Potato, Fruit and Vegetable Growing (Samokhvalovich)
Rape	Chicken interferon protein is synthesized	Belarusian State University (Minsk), Institute of Biophysics and Cell Engineering (Minsk)
Rape	Resistant to glyphosate*	Belarusian State University (Minsk), Institute of Genetics and Cytology (Minsk)



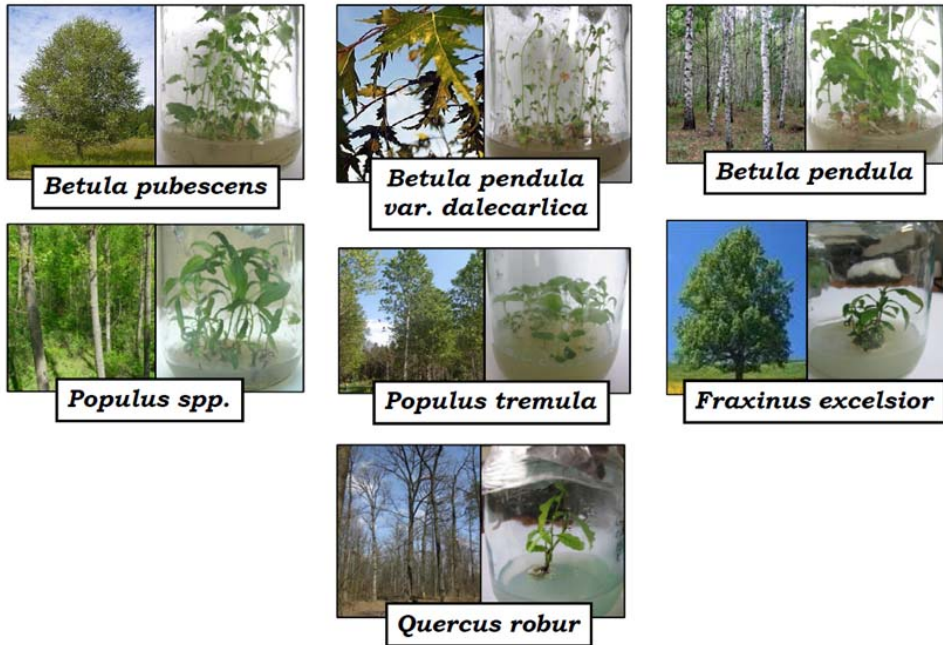
Organisms	Effect	Institution
Flax-flax	Modified cell wall structure	Institute of Genetics and Cytology (Minsk) Institute of Flax (Ustiye), Belarusian State Technological University (Minsk)
Flax-flax	Resistant to glyphosate	Institute of Genetics and Cytology (Minsk)
Clover meadow	Increased yield	Central Botanical Garden (Minsk), Institute of Experimental Botany (Minsk)
Cranberry	Improved taste	Central Botanical Garden (Minsk)
Tobacco, Arabidopsis	Resistant to heavy metals and petroleum products**	Institute of Genetics and Cytology (Minsk)
Tobacco	With accelerated development and increased productivity**	Institute of Genetics and Cytology (Minsk)

\* – field experiments

\*\* – model objects

The possibility of GMO field trials is provided by a well-developed national biosafety system, which includes legislation in all aspects of genetic engineering activities (National Co-ordination Biosafety Centre 1998-2017). Food safety is guaranteed by a national network of 18 GMO detection laboratories (Dromashko 2015).

A collection of microclonal forest plants was started at the Laboratory of Genetics and Biotechnology (Head – Professor Vladimir E. Padutov), the Institute of Forest (Gomel). The collection includes more than 80 clones and 25 species of forest cultures. Biotechnological methods for cultivation of forest planting material were developed. Exemplary items from this collection are presented in Figure 1.



**Figure 1.** Examples of items from the collection of microclonal forest plants (Source: Institute of Forest, Gomel).

Systems of genetic certification for 10 agricultural crops were developed at the Institute of Genetics and Cytology in cooperation with the State Inspection for Testing and Protection of Plant Varieties: wheat, barley, tomato, potato, sunflower, pear, apple, flax, soy, and sugar beet. Standard DNA Certificates for agricultural plant varieties were developed: wheat – 38 varieties, tomato – 33 varieties and hybrids, potatoes – 60 varieties, flax – 39 varieties (see examples in Fig. 2).

<p><b>Tomato variety Sibiryak 723</b>  A154 B137 C224 D103 E158 F213 G122 H196 I147 J136 K159,187 L222 M165 N351 O268</p>
<p><b>Variety of soft wheat Spectrum</b>  A123 B118 C141 F190 G247 H149 I179 J206 K174 L79 M210 N144 O119 P184 Q117 Rnull  S149 T152 U181 W252</p>

**Figure 2.** Examples of DNA Certificates

## 4. DNA barcoding as a method for organism identification

DNA barcoding is a system for fast and accurate species identification that makes ecological system more accessible using a short DNA sequence instead of the whole genome, and it is applied for eukaryotes. A short DNA sequence is generated from the standard region of a genome known as a marker. This marker is different for various species like CO1 cytochrome c oxidase 1 for animals, *matK+rbcL* (chloroplast maturase K and ribulose-1.5-bisphosphate carboxylate) for plants and internal transcribed spacer (ITS) for fungi.

Use of DNA sequences for species identification has a long history (Woese, Fox 1977; Bartlett, Davidson 1991), for example, and etc.), but it received significant attention only after a formal proposal of Dr. Paul D.N. Hebert (University of Guelph, Ontario, Canada) in 2003 (Hebert et al. 2003). Therefore, he was named the “father of DNA barcoding”. Until now, all pros and cons of barcoding have been under discussion in literature, in particular the issues related to the exaggeration of its significance to the detriment of traditional systematic methods and results (Will, Rubinoff 2004; Will et al. 2005; Rubinoff et al. 2006a, b; Meier 2008).

This method underlies a number of international research projects (Tab. 3). The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) is an international initiative devoted to developing of DNA barcoding as a global standard for the identification of biological species. CBOL has 200 member organizations from 50 countries (Barcode of Life 2010-2017). The International Barcode of Life project (iBOL) is the largest biodiversity genomics initiative ever undertaken (International Barcode of Life 2017). Hundreds of biodiversity scientists, specialists in genomics, technologists and ethicists from 25 nations are working together to create a digital identification system for all multi-cellular life on the DNA barcoding basis. ECBOL – the European Consortium for the Barcode of Life was established as part of the research infrastructure efforts of EDIT, the European Distributed Institute of Taxonomy.

In the first phase of operations (2010-2015), iBOL collaborators barcoded five million specimens representing 500 thousand species (International Barcode of Life 2017).

The barcode of life data system BOLD – an information tool that helps in the acquisition, storage, analysis and publication of DNA barcode records, as well as in composing of molecular, morphological and distributional data (Ratnasingham, Hebert 2007) was developed. Presently it contains data on 178,308 animals, 65,773 plants, and 20,901 fungi and other life species (BOLD System 2014).

**Table 3.** Consortium for the Barcode of Life (CBOL) and International Barcode of Life project (iBOL) main tasks and activities, their distribution

CBOL	iBOL
Promote the adoption of barcoding as a global standard	Make barcoding an operational reality
Working Groups set standards, promote development of new technologies and analyses	Working Groups generate barcode data and new barcoding protocols
Promote international participation	Conduct international barcoding activities
Networking, training and dissemination of protocols	Training related to iBOL WGs
Representation to CBD, CITES, FAO and other international bodies	Implement agreements and projects within Convention guidelines

## 5. Standard DNA barcode for animals

The cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial region (COI) is emerging as a standard barcode region for higher animals. It is 648 nucleotide base pairs long in most groups, a very short sequence relative to 3 billion base pairs in the human genome. This site is located at 5' end, surrounded by conserved DNA sequences. Thanks to this, it is possible to develop conservative primers to carry out PCR. It is important that the difference in genetic distances within the species in multicellular organisms is less than 3%, while between the species this figure varies in the range of 10-25% (Bucklin et al. 2011).

## 6. Barcode regions of plants

There are several plastid DNA loci – candidates for barcoding: *matK* – chloroplast maturase *K*, *rbcL* – chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylate, *trnH-psbA*, *atpF-F*, *psbkl*, *rpoCI*, *rpoK*, *rpoC2*, *accD*, *ndhJ*, *trnL*, *ycf5*.

They should meet the following criteria:

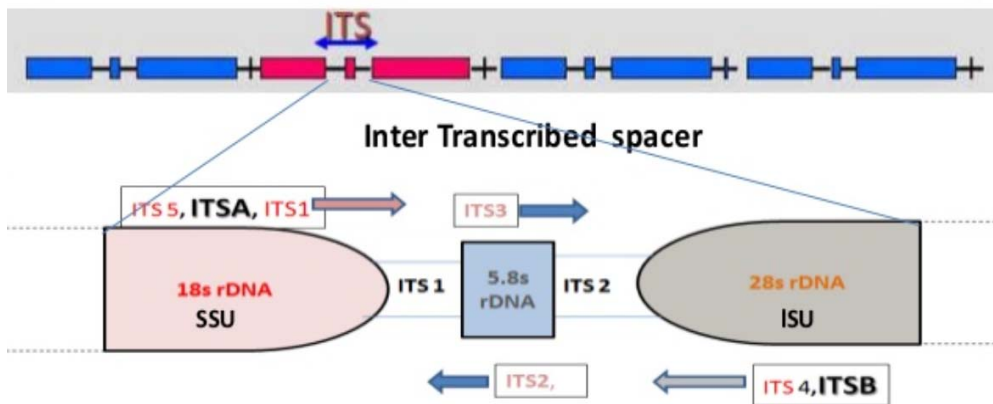
- discrimination (barcoding regions must be different for each species; ideally, you look for a single DNA locus which differs in all species);
- universality (since barcoding protocols (typically) amplify a region of DNA by PCR, you need primers that will amplify consistently), and

- robustness (since barcoding protocols (typically) amplify a region of DNA by PCR, you also need to select both a locus, that can be reliably amplified, and sequences).

Thus, according to the CBOL (the groups working with plants) barcoding consortium recommendations, only *rbcl* and *matK* chloroplast genes can be recognized as universal plant barcodes (DNA barcode for land plants 2009).

## 7. Standard barcode region for Prokaryote

Figure 3 demonstrates inter transcribed spacer (ITS) used for barcoding in Prokaryotes.



**Figure 3.** Barcode region for Prokaryotes (Chase et al. 2005; Kress et al. 2005; Schoch et al. 2012)

This choice of the barcode region for prokaryotes has been made for the following reasons:

- easy availability;
- high copy number;
- high degree of variation.

## 8. Advantages and disadvantages of DNA barcoding

Table 4 demonstrates strengths and weaknesses of DNA barcoding. Despite a number of drawbacks, DNA barcoding has many applications in various fields like preservation of natural resources, protection of endangered species, control of

agricultural pests, identification of disease vectors, monitoring of water quality, authentication of natural health products, and identification of medicinal plants.

**Table 4.** DNA barcoding strengths versus its weaknesses

DNA barcoding strengths	DNA barcoding weaknesses
Alternative taxonomic identification tool	No universal DNA barcode region
Identification of new species	Difficult to resolve recently diverged species
Can be used for all life stages	Identifies Inter-specific genetic variation only
Reveals undescribed species	Single approach

Another advantage of DNA barcoding is that it allows identification at all life stages (eggs, larvae, nymphs, pupa, and adults), fragments/products of organisms, stomach contents, and etc.

## 9. Examples of DNA barcoding application

The introduction of molecular genetic methods for the identification of species is promising for the customs control system in import and export of biological raw materials. This will allow clear control over extraction volumes, export and import of the approved list of economically significant species, as well as to identify cases of products' falsification (Huffman 2011). Using this method, one can detect the replacement of some plants by the others. For instance the barcode of DNA has allowed exposure of the producers of vegetable tea, which added extraneous ingredients to tea bags. Also, in Malaysia, the wood of the rubber tree was treated with quinine to give it a bitter taste so that it could be taken for *Eurycoma longifolia*, or Malaysian ginseng (this medicinal plant traditionally used for the treatment of malaria, diabetes and a number of other diseases, as well as in bodybuilding).

In Belarus, DNA barcoding investigations are carried out at the National Academy of Sciences (the Institute of Genetics and Cytology, the Scientific and Practical Center for Bioresources) and the Belarusian State University. In August of 2018, the Institute of Genetics and Cytology in cooperation with the Scientific and Practical Center for Bioresources held an International Workshop on DNA Barcoding for countries of the Commonwealth of Independent States with participation of Dr. Alex Borisenko, Associate Director for International Development (Centre for Biodiversity Genomics, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Canada).

## 10. Conclusions

The molecular genetic methods based on DNA markers are widely used in genetic diversity study and biodiversity certification. The methods used so far have employed such markers as RFLP, VNTR, SSLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP, STR, SFP, DArT, RAD, etc.

Belarusian researchers have been using these methods for certification of agricultural and wild plants, animals, birds, and fish, as well as for creation of their DNA and cell culture banks.

Since 2003, the DNA barcoding method has become increasingly popular. A number of international research projects have been concerned with DNA certification of all biological diversity existing on our planet as their ultimate goal. DNA barcoding has many applications in various fields like preservation of natural resources, protection of endangered species, control of agricultural pests, and even detection of product and medicine falsification. In Belarus, DNA barcoding investigations are carried out in the National Academy of Sciences (the Institute of Genetics and Cytology, the Scientific and Practical Center for Bioresources) and the Belarusian State University.

## References

- Barcode of Life*. 2010–2017. What is CBOL? Available from: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-cbol> (cited May 26 2017).
- Bartlett S. E., Davidson W. S. 1991. Identification of thunnus tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 48(2): 309–317.
- BOLD Systems*. 2014. Available from: <http://www.barcodinglife.org> (cited May 26 2017).
- Bucklin A., Steinke D., Blanco-Bercial L. 2011. DNA barcoding of marine metazoan. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 3: 471–508.
- Carlson B. 2008. SNPs – A shortcut to personalized medicine. *GEN (Gen Engin. Biotech. News)*, 28(12), Available from: <http://www.genengnews.com/gen-articles/snps-a-shortcut-to-personalized-medicine/2507> (cited May 26 2017).
- Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J. M., Kesanakurthi R. P., Haider N., et al. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1462): 1889–1895.
- DNA barcode for land plants*. 2009. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106(31): 12794–12797.
- Dromashko S. 2015. Genetically modified organisms: potential health consequences. *Polish J. Appl. Sci.*, 1(3): 102–108

- Flavell A. J., Knox M. R., Pearce S. R., Ellis T. H. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.*, 16(5): 643–650.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., de Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270(1512): 313–321.
- Huffman M. 2011. DNA barcode could soon reduce 'Seafood Fraud'. Consumer Affairs. Available from: <https://www.consumeraffairs.com/mercury-in-seafood-and-fish-recalls? page=2> (cited May 26 2017).
- International Barcode of Life*. 2017. Available from: <http://www.ibol.org> (cited: May 26 2017).
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. W. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006): 67–73.
- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A. H. 2010. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.*, 121(8): 1419–1430.
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. H. 1999. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.*, 98(5): 704–711.
- Kalendar R., Schulman A. H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat. Protoc.*, 1(5): 2478–2484.
- Kress J. W., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 8369–8374.
- Meier R. 2008. DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges. *The New Taxonomy* (Wheeler Q. D. ed.). New York, CRC Press: 95–127.
- National Co-ordination Biosafety Centre*. 1998–2017. Legislation. Available from: <http://biosafety.org.by/legislation> (cited May 26 2017).
- Ratnasingham S., Hebert P. D. N. 2007. The Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes*, 7(3): 355–364 (<http://www.barcodinglife.org>).
- Rubioff D., Cameron S., Will K. 2006a. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends Ecol. Evol.*, 21(1): 1–2.
- Rubioff D., Cameron S., Will K. 2006b. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *J. Hered.*, 97(6): 581–594.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 109(16): 6241–6246.
- Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98(3): 503–517.
- Tautz D., Schlötterer C. 1994. Simple sequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4(6): 832–837.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23(21): 4407–4414.
- Weiss K. M. 1998. In search of human variation. *Genome Res.*, 8(7): 691–697.



- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18(24): 7213–7218.
- Will K. W., Mishler B. D., Wheeler Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol.*, 54(5): 844–851.
- Will K. W., Rubinoff D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20(1): 47–55.
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18(22): 6531–6535.
- Woese C. R., Fox G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74(11): 5088–5090.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176–183.

Wioletta **Wasilewska-Dębowska** / Paweł **Rogowski**  
Aleksandra **Urban** / Elżbieta **Romanowska**

Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
e-mail: romanela@biol.uw.edu.pl

**Streszczenie:** Rośliny o metabolizmie C4 występują głównie w strefie tropikalnej, subtropikalnej oraz w strefach o podwyższonej temperaturze. Szlak metaboliczny C4 jest serią przemian biochemicznych zwiększających stężenie CO<sub>2</sub> wokół Rubisco i ograniczających fotooddychanie. W liściach roślin C4 występują dwa typy komórek uczestniczących w wiązaniu CO<sub>2</sub>: mezofilu (M) i otaczające wiązkę przewodzą (BS), o chloroplastach zróżnicowanych pod względem biochemicznym, morfologicznym, jak i fizjologicznym. Mechanizm koncentracji CO<sub>2</sub>, rozwinięty przez rośliny C4 pozwala na wydajne prowadzenie fotosyntezy w warunkach niskiego stężenia CO<sub>2</sub>, wysokich natężeń światła, podwyższonej temperatury i suszy. Dzięki temu fotosyntetyczna produktywność roślin C4 jest 1,5-2 razy wyższa niż roślin C3. Wynika to ze wzrostu stężenia CO<sub>2</sub> (1-2%) w BS, w miejscu działania Rubisco. Aktywność specyficzna Rubisco u roślin C4 jest również około dwa razy wyższa niż u roślin C3, potrzeba o 50-80% mniej enzymu i stąd wynika mniejsze zapotrzebowanie na azot. Współczynnik wykorzystania azotu (NUE) jest około 1,3-4 razy wyższy u roślin C4 niż C3. Nie jest jednak znany koszt wykorzystania azotu w regeneracji rybulozo-1,5-bisfosforanu oraz dystrybucja azotu do białek kompleksów tylakoidowych. W asymilacji azotu bardzo ważne są czynniki redoks, pochodzące z fotosyntetycznego transportu elektronów. Asymilacja azotu może zatem regulować asymilację CO<sub>2</sub> i zależeć od natężenia światła. Metabolizm węgla (C) jest sprzężony z metabolizmem azotu (N), zatem dystrybucja C i N oraz regulacja ich metabolizmu ma fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania roślin C4 w zmiennym środowisku.

**Słowa kluczowe:** fotosynteza, metabolizm azotowy, rośliny C4

## 7

# Integration of carbon and nitrogen metabolism in C4 plants

Wioleta **Wasilewska-Dębowska** / Paweł **Rogowski**  
Aleksandra **Urban** / Elżbieta **Romanowska**

Department of Molecular Plant Physiology, Institute of Botany, Warsaw University  
1, Miecznikowa Street, 02-096 Warsaw, Poland

e-mail: romanela@biol.uw.edu.pl

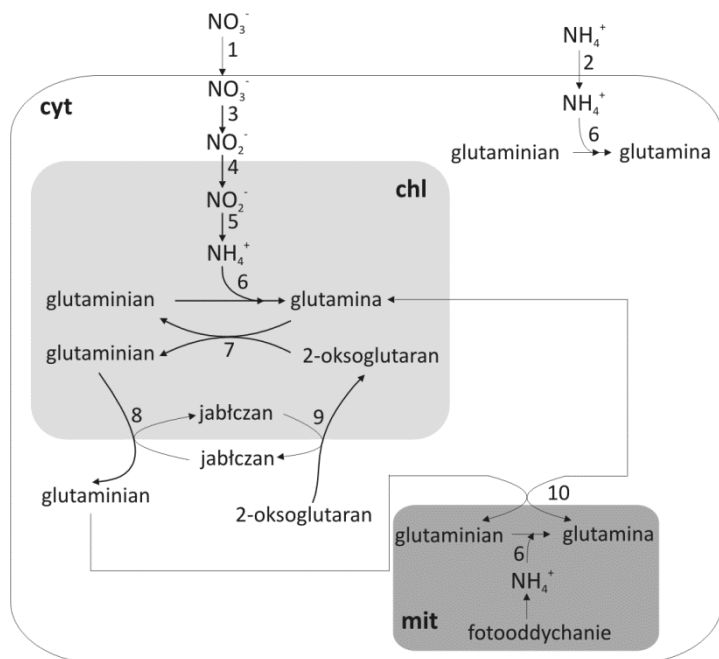
**Abstract:** Plants of C4 type metabolism occur mainly in the tropical and subtropical zones and in zones of elevated temperatures. The metabolic pathway C4 comprises a series of biochemical transformations leading to increased concentration of CO<sub>2</sub> in the vicinity of Rubisco and restricted photorespiration. The leaves of C4 plants contain two types of cells taking part in CO<sub>2</sub> binding: mesophyll (M) and bundle sheaths (BS) whose chloroplasts differ in biochemical, morphological and physiological properties. The mechanism of CO<sub>2</sub> concentration developed by C4 plants permits efficient photosynthesis in the conditions of low CO<sub>2</sub> concentration, elevated temperature and draughts. Thanks to this mechanism the photosynthetic productivity of C4 plants is by 1.5-2 times greater than that of C3 plants. It is related to increased concentration of CO<sub>2</sub> (1-2%) in BS, so the site of Rubisco activity. The specific activity of Rubisco in C4 plants is also about twice higher than in C3 plants, as they need by 50-80% less of the enzyme and thus also need less nitrogen. The nitrogen use efficiency (NUE) coefficient is by about 1.3-4 higher in C4 than in C3 plants. However, the cost of using nitrogen in regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate and distribution of nitrogen to proteins of thylakoid complexes are not known. Nitrogen assimilation strongly depends on the redox factors coming from the photosynthetic transport of electrons. The assimilation of nitrogen can thus regulate the assimilation of CO<sub>2</sub> and may depend on the intensity of insolation. The carbon metabolism is coupled to the metabolism of nitrogen, so the distribution of carbon and nitrogen and regulation of their metabolism is of fundamental importance for C4 plants adaptation and functioning in varied environment conditions.

**Keywords:** photosynthesis, nitrogen metabolism, C4 plants

## 1. Wstęp

Azot jest makroelementem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Stanowi około 2-4% suchej masy roślin i jest czwartym, co do ilości, pierwiastkiem występującym w roślinach. Głównymi, dostępnymi dla roślin wyższych, formami azotu nieorganicznego w roztworze glebowym są azotany ( $\text{NO}_3^-$ ) i jony amonowe ( $\text{NH}_4^+$ ), których zawartość w ekosystemach jest bardzo zróżnicowana (Miller i Cramer 2004). Rośliny nie mogą bezpośrednio korzystać z azotu atmosferycznego, którego zawartość w powietrzu sięga około 78%. Symbioza z grzybami mikoryzowymi lub bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny, jest alternatywnym sposobem pozyskania azotu przez niektóre gatunki roślin.

$\text{NH}_4^+$ , poza transportem z roztworu glebowego, powstają w mitochondriach roślinnych podczas fotooddychania, pobierane są z roztworu glebowego przy udziale dwóch rodzajów transporterów: niskiego lub wysokiego powinowactwa (Howitt i in. 2000). Transportery aktywowane są wysoką lub niską zawartością  $\text{NH}_4^+$  w glebie.  $\text{NO}_3^-$  pobierane są z wykorzystaniem trzech głównych systemów: (1) konstytutywnego i wykazującego wysokie powinowactwo do  $\text{NO}_3^-$ , (2) konstytutywnego o niskim powinowactwie oraz (3) indukowalnego, o wysokim powinowactwie do  $\text{NO}_3^-$  (Crawford i Glass 1998). Gatunki roślin różnią się zdolnością do pobierania i metabolizowania azotu. Większość roślin lądowych, jako źródło azotu nieorganicznego, wykorzystuje zarówno  $\text{NO}_3^-$  jak i  $\text{NH}_4^+$  w różnych proporcjach, zależnie od specyficznych preferencji gatunku.  $\text{NO}_3^-$  są redukowane w cytozolu komórki roślinnej do jonów azotynowych ( $\text{NO}_2^-$ ), reakcja ta jest katalizowana przez reduktazę azotanową (NR) (Oaks 1994). Następnie  $\text{NO}_2^-$  są transportowane do chloroplastów i redukowane do  $\text{NH}_4^+$  przy udziale reduktazy azotynowej (NiR), zależnej od ferredoksyny (Ryc. 1). Redukcja ferredoksyny związana jest z fotosyntetycznym transportem elektronów, dlatego redukcja  $\text{NO}_3^-$  jest procesem zależnym od światła. Redukcja  $\text{NO}_2^-$  do  $\text{NH}_4^+$  konkuruje zatem z asymilacją  $\text{CO}_2$  o produkty fazy świetlnej fotosyntezy.  $\text{NH}_4^+$  są wykorzystywane do syntezy glutaminianu w tzw. cyklu GS-GOGAT (syntetazy glutaminowej – syntazy glutaminianowej) oraz dehydrogenazy glutaminianowej (GDH). W ten sposób odbywa się przyswajanie co najmniej 90%  $\text{NH}_4^+$ , a więc główny przepływ azotu do roślin odbywa się za pośrednictwem cyklu GS-GOGAT.



**Rycina 1.** Schemat asymilacji azotu przez rośliny. Miejsca reakcji to: mitochondrium (mit); chloroplast (chl); cytoplazma (cyt). Enzymy oznaczono numerami: 1 – transporter  $\text{NO}_3^-$ ; 2 – transporter  $\text{NH}_4^+$ ; 3 – reduktaza azotanowa; 4 – transporter  $\text{NO}_2^-$ ; 5 – reduktaza azotynowa; 6 – syntetaza glutaminowa; 7 – syntaza glutaminianowa; 8 – transporter glutaminian-jabłczan; 9 – transporter 2-oksoglutaran-jabłczan; 10 – transporter glutaminian-glutamina. Źródło: opracowanie własne na podstawie: Kopriva 2011.

**Figure 1.** Schematic of plant nitrate assimilation. Reactions take place in: mitochondrium (mit), chloroplast (chl); cytoplasm (cyt). Enzymes are symbolized by numbers: 1 – nitrate transporter, 2 – ammonium transporter, 3 – nitrate reductase, 4 – nitrite transporter, 5 – nitrite reductase, 6 – glutamine synthetase, 7 – glutamate synthase, 8 – plastidic glutamate–malate translocator, 9 – plastidic 2-oxoglutarate–malate translocator, 10 – mitochondrial glutamate – glutamine translocator. Modified (Kopriva 2011).

Stężenie  $\text{CO}_2$  ma wpływ na rodzaj jonów pobieranych przez rośliny. Wzrost atmosferycznego stężenia  $\text{CO}_2$  faworyzuje rośliny C3 w warunkach, w których  $\text{NH}_4^+$  dominują jako źródło azotu (N); rośliny C4 rosną w miejscach, gdzie głównym źródłem azotu są  $\text{NO}_3^-$  (Bloom i in. 2012). Asymilacja  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  jest regulowana przez zapotrzebowanie roślin na azot oraz jego dostępność, i jest ściśle powiązana z metabolizmem węgla. Koordynacja obu dróg zachodzi na różnych etapach metabolicznych. Pobieranie  $\text{NO}_3^-$  jest stymulowane w obecności  $\text{NO}_3^-$

i hamowane przez aminokwasy oraz  $\text{NH}_4^+$ . Procesy te są regulowane przez światło i stężenie  $\text{CO}_2$  (poprzez dostępność węglowodanów powstających podczas fotosyntezy) (Stitt i in. 2002). Metabolizm azotu (N) jest sprzężony z metabolizmem węgla (C); ograniczenie dostępności N wpływa hamująco na ekspresję genów białek zaangażowanych w procesie fotosyntezy, z jednoczesną indukcją genów kodujących enzymy metabolizmu wtórnego i degradacji białek (Schlüter i in. 2012). Metabolizm azotu jest nie tylko kluczowym procesem w fizjologii roślin, ale również ważną częścią globalnego cyklu jego przemian. Dostępność azotu w glebie jest czynnikiem ograniczającym wzrost roślin w różnych ekosystemach, szczególnie w rejonach tropikalnych. Znajomość wykorzystania azotu, przez różne gatunki roślin i o różnym typie metabolizmu, jest ważna w aspekcie składu gatunkowego ekosystemów i ich produktywności.

## 2. Asymilacja azotu a reakcje świetlne fotosyntezy

Wiele gatunków roślin preferuje asymilację N w postaci  $\text{NO}_3^-$  w porównaniu z  $\text{NH}_4^+$ , pomimo znacznie większych kosztów energetycznych asymilacji  $\text{NO}_3^-$ , które wymagają 8 elektronów do redukcji do  $\text{NO}_2^-$ . Jest to reakcja metaboliczna, wymagająca najwięcej energii po asymilacji  $\text{CO}_2$ . Ze stosunku C/N wyliczono, że 20% elektronów powstających w reakcjach świetlnych fotosyntezy, wykorzystywanych jest do redukcji  $\text{NO}_3^-$ . Zatem, podobnie jak  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  wykorzystując elektrony z reakcji świetlnych, jest substratem reakcji Hilla. Podczas asymilacji  $\text{NO}_3^-$ , wydzielanie tlenu przez liście może być szybsze niż wydzielanie zależne od  $\text{CO}_2$ . Wykazano, że u kukurydzy związki azotu ( $\text{NO}_3^-$  lub  $\text{NO}_2^-$ ) hamują asymilację  $\text{CO}_2$ , ale nie mają bezpośredniego wpływu na transport elektronów przez PSII, chociaż obserwowano obniżenie kwantowej wydajności fotoukładu II (Fv/Fm) oraz wzrost niefotochemicznego rozpraszania energii (NPQ) (Foyer i in. 1994a). Ponadto stwierdzono, że  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NH}_4^+$  powodowały obniżenie fosforylacji białek anten LHCII, co może przekładać się na zmienne wykorzystanie energii świetlnej przez oba fotoukłady na skutek obniżenia mobilności anten PSII (Allen 1992, Terashima i in. 2016). Wykazano również, że deficyt azotowy nie ma wpływu na asymilację  $\text{CO}_2$  w warunkach słabego oświetlenia, natomiast w wysokim natężeniu światła, fotosynteza była hamowana (Khamis i in. 1990). Podawanie do liści kukurydzy  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NH}_4^+$  przy zwiększającym się natężeniu światła w zakresie od 250 do 700  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$  powodowało około dwukrotny wzrost zawartości aminokwasów w ciągu godziny, w czasie kiedy wiązanie  $\text{CO}_2$  maksymalnie się obniżyło (Foyer i in. 1994b). Jednocześnie stwierdzono, że po podaniu azotu do liści z deficy-

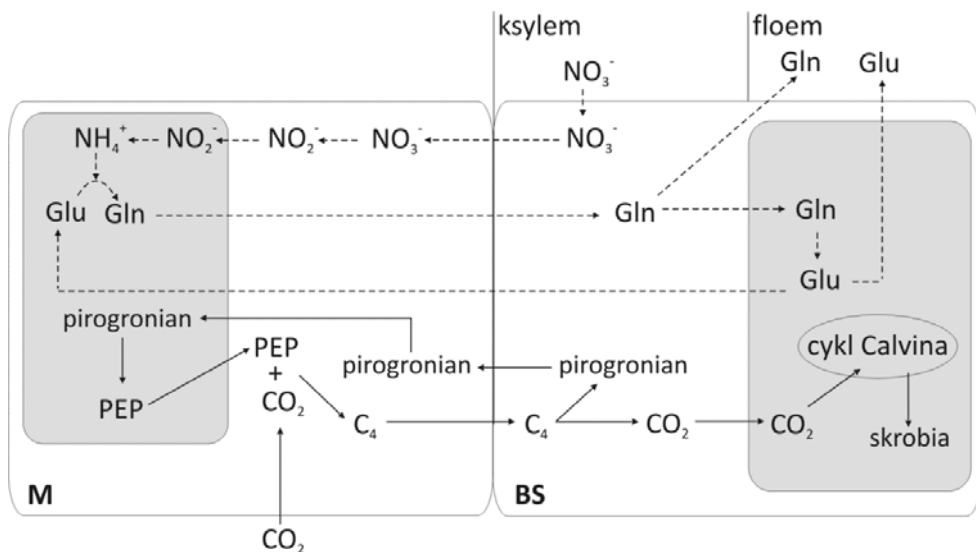
tem tego pierwiastka, synteza cukrów obniżyła się, podczas gdy natężenie wiązania C pozostawało praktycznie niezmienione. Wskazuje to, że dodatkowy C jest potrzebny do podtrzymania asymilacji N, i zachodzi szybkie przesunięcie w wykorzystaniu C do syntezy aminokwasów kosztem syntezy cukrów.

### 3. Enzymy odpowiedzialne za interakcję N/C

Trzy kluczowe enzymy: karboksylaza fosfoenolopirogronianowa (PEPC), reduktaza azotanowa (NR) i syntaza fosfosacharozowa (SPS), związane z wiązaniem węgla, asymilacją azotu i biosyntezą sacharozy, uczestniczą w interakcji C/N. Reagują na wzrost stężenia  $\text{NO}_3^-$  zmianą w wykorzystaniu nowo związanego C pomiędzy syntezę cukrów a aminokwasów. SPS kontroluje syntezę sacharozy *in vivo*, i jest konieczna do utrzymania równowagi pomiędzy natężeniem fotosyntezy, eksportem sacharozy i akumulacją skrobi w chloroplastach. Stwierdzono, że wysokie stężenie  $\text{NO}_3^-$  powodowało obniżenie aktywności SPS w liściach kukurydzy. Natomiast zawartość transkryptów NR wzrosła o około 50% już w ciągu 2 h od podania  $\text{NO}_3^-$ , a aktywność i zawartość białka zwiększyła się po 12 h (Melzer i in. 1989). Aktywność PEPC również wzrosła znacznie (3,8 raza), kiedy do oświetlanych liści podawano  $\text{NO}_3^-$  (van Quy, Champigny 1992). Głównym mechanizmem regulującym aktywność enzymów PEPC, SPS i NR jest odwracalna fosforylacja białka (Ryc. 2). Fosforylacja PEPC, kluczowego fotosyntetycznego enzymu roślin C4 i CAM, aktywuje aktywność enzymu i zmniejsza jego wrażliwość na hamujące działanie jabłczanu, zwiększa też jego wrażliwość na aktywator glukozo-6-P. Wysokie stężenie  $\text{NO}_3^-$  zwiększa indukowaną światłem fosforylację oraz ma wpływ na właściwości katalityczne enzymu (Champigny 1995). Aktywacja SPS i NR różni się od PEPC. Aktywność enzymów zwiększa się, gdy enzymy są defosforylowane na świetle lub w obecności  $\text{NO}_3^-$ , i obniża się w ciemności, po ich ufosforylowaniu. Wydaje się, że  $\text{NO}_3^-$  pełnią funkcję sygnałową i modelują aktywność enzymów poprzez wpływ na aktywność kinaz, nie wpływają natomiast na fosfatazy (van Quy, Champigny 1992, Miller i in. 2007). Tym samym zmieniają przepływ węgla do cukrów lub aminokwasów. Brak  $\text{NO}_3^-$ , poprzez wpływ na aktywność kinazy NR, reguluje interakcję C/N. Uważa się, że natężenie redukcji  $\text{NO}_3^-$  jest głównym czynnikiem regulującym asymilację azotu w liściach (Foyer i in. 1994b). Mechanizmy odpowiedzialne za współdziałanie pomiędzy  $\text{NO}_3^-$  a kinazą oraz indukowaną odpowiedzią metaboliczną nie były dotychczas przedmiotem badań.







**Rycina 3.** Schemat opisujący główne etapy asymilacji węgla i azotu w komórkach mezofilowych (M) i pochwów okołowiązkowych (BS) u kukurydzy. Transport związków węgla zaznaczono strzałkami ciągłymi, azotu – strzałkami przerywanymi; ciemne prostokąty – to chloroplasty. Źródło: opracowanie własne na podstawie Kopriva i Koprivova 2005.

**Figure 3.** Schematic representation of distribution of major steps in assimilation of carbon and nitrogen, between mesophyll (M) and bundle sheath (BS) cells of maize. Dark shaded rectangle, chloroplasts. Transport steps of C compounds are marked by *solid arrows*, *dashed* symbolize transport of N compounds Modified (Kopriva i Koprivova, 2005).

Brak jest również informacji dla roślin C<sub>4</sub> o mechanizmach dystrybucji N pomiędzy komórki mezofilowe (M) i komórki pochwów okołowiązkowych (BS). U roślin C<sub>4</sub>, enzymy uczestniczące w asymilacji azotu, są zlokalizowane specyficznie komórkowo. Reduktaza azotanowa (NR) u wszystkich podtypów metabolicznych roślin C<sub>4</sub>: NADP-ME, NAD-ME i PEP-CK (podział na trzy podtypy zależy od udziału enzymów uczestniczących w dekarboksylacji kwasów czterowęglowych w komórkach BS) jest obecna w cytozolu komórek mezofilowych (Mellor, Tregunna 1971). Taka lokalizacja enzymu może zmniejszać współzawodnictwo o czynniki redukcyjne pomiędzy asymilacją N i C. Powstające NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, transportowane do chloroplastów, są akceptorem elektronów z łańcucha fotosyntetycznego, i ich redukcja jest sprzężona z wydzielaniem O<sub>2</sub>. Zatem lokalizacja NR w M ogranicza wydzielanie O<sub>2</sub> w BS, jak też akumulację toksycznego NO<sub>2</sub><sup>-</sup> w tych komórkach. Natomiast są sprzeczne doniesienia dotyczące lokalizacji GS-GOGAT w roślinach C<sub>4</sub>. Stwierdzono, że u kukurydzy, oba enzymy znajdują się zarówno w komórkach M, jak BS, ale jest ich więcej w BS. Natomiast u innych gatunków roślin C<sub>4</sub> enzymy

te obecne są tylko w mezofilu. Becker i in. (2000) wykazali, że cytozolowa i plastydowa izoforma GS jest obecna w obu typach komórek, natomiast Fd-GOGAT (zależna od ferredoksyny), znajduje się tylko w BS. Wydaje się, że obserwowane różnice w lokalizacji enzymów w dużej mierze mogą wynikać ze sposobu izolacji obu typów komórek z liści badanych roślin, której efektem są wzajemne zanieczyszczenia frakcji poszczególnych komórek. Uważa się, że kompartmentacja enzymów, pomiędzy dwa typy komórek u roślin C<sub>4</sub>, jest fundamentalnym, ewolucyjnym przystosowaniem do asymilacji azotu.

NR jest dobrze poznanym enzymem, ekspresja genów (występuje 1 lub 2) regulowana jest przez zegar biologiczny i indukowana przez światło oraz cukry (w ciemności). Poziom transkryptów jest modulowany dostępnością CO<sub>2</sub>, zmniejsza się kiedy asymilacja CO<sub>2</sub> ulega obniżeniu (np. podczas suszy) i wzrasta po ekspozycji roślin na zwiększone stężenie CO<sub>2</sub>. Szybkie zmiany aktywności enzymu w warunkach zmiany czynników środowiskowych, dotyczą regulacji potranslacyjnej. Kiedy następuje gwałtowny spadek natężenia fotosyntezy, NR jest szybko i odwracalnie fosforylowana. Fosforylacja jest mechanizmem powodującym inaktywację enzymu i jest sygnałem do degradacji białka (Lillo i in. 2004). Szybka odpowiedź jest konieczna dla zahamowania akumulacji toksycznego NO<sub>2</sub><sup>-</sup> w liściach. NR znajduje się w liściach i korzeniach, i aktywność enzymu bardzo się różni w tych organach. Jednak nawet niewielka aktywność tego enzymu jest konieczna do utrzymania właściwego bilansu C/N.

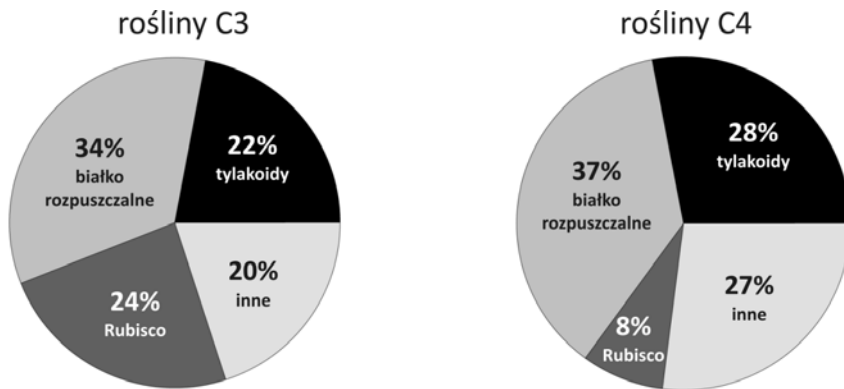
GS i GOGAT kodowane są przez rodzinę 3 do 6 genów, występują w różnych organach i częściach komórki, i ich funkcja jest różna. Izoforma GS1 występuje w brodawkach korzeniowych i uczestniczy w asymilacji NH<sub>3</sub> powstającego podczas wiązania N atmosferycznego. Natomiast izoforma GS2 znajduje się w tkankach zielonych, ekspresja enzymu jest indukowana światłem i uczestniczy on w reasymilacji NH<sub>3</sub> powstającego w czasie fotooddychania. GS jest regulowana na poziomie transkrypcji, translacji i posttranslacyjnie. U roślin C<sub>4</sub>, izoforma GS1 wykazuje wysoką aktywność w cytozolu i jest ona równa lub wyższa od aktywności obserwowanej w chloroplastach (izoforma GS2) (Becker i in. 2000). Uważa się, że aktywność GS1 w liściach koreluje z aktywnością fotosyntetyczną. Akumulacja obu izoform w komórkach M i BS różni się, GS1 występuje głównie w M, natomiast w BS występują obie izoformy, w podobnych proporcjach. U roślin C<sub>4</sub>, ze względu na brak fotooddychania, mniej NH<sub>3</sub> jest produkowane w liściach niż u roślin C<sub>3</sub>, stąd mniejszy udział GS. Redukcja NO<sub>3</sub><sup>-</sup> w M wskazuje na potrzebę transportu zredukowanej formy N pomiędzy oba typy komórek. Stąd większe zapotrzebowanie na cytozolową izoformę GS.

Reduktaza azotynowa (NiR) u kukurydzy występuje w chloroplastach mezofilu, natomiast u roślin C4 z granowymi chloroplastami w BS, jest zlokalizowana w chloroplastach BS. Mimo licznych badań dotyczących procesów asymilacji N, mało znane są molekularne mechanizmy jego pobierania i metabolizmu. Wiele aminokwasów ma wpływ na asymilację N. Glutamina pełni ważną funkcję w pobieraniu  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$ , natomiast glutaminian, cysteina i asparagina hamują redukcję  $\text{NO}_3^-$ . Cukry uczestniczą również w regulacji pobierania N, jednak mechanizm ich działania nie jest jasny. Specyficzną rolę w pobieraniu N pełnią cytokiny, które syntetyzowane są w korzeniach przy określonym zaopatrzeniu w N. Kiedy są transportowane do pędu, indukują ekspresję genów odpowiedzialnych za asymilację N (Mok, Mok 2001). Ponadto, mogą być również transportowane z pędu do korzeni, indukując pobieranie jonów  $\text{NO}_3^-$ .

Liczne prace opisują, w jaki sposób warunki wzrostu wpływają na aktywność fotosyntetyczną roślin C4. Jest jednak niejasne, jaki wpływ na aklimatyzację roślin mają zmiany anatomiczne liścia i aktywność procesów metabolicznych. Brak jest informacji, w jaki sposób natężenie światła i zawartość N wpływają na wydajność koncentracji  $\text{CO}_2$  w BS. Wydaje się, że niskie natężenie światła (LL) i niska zawartość N (LN) mogą ograniczać ten proces. Obniżenie zawartości N może nie tylko zredukować wzrost liści, ale również wykorzystanie N w kluczowych procesach biochemicznych. Wykazano, że w roślinach *Miscanthus* niekorzystne warunki wzrostu (LL i LN) indukowały zmiany anatomiczne i biochemiczne w liściach, bez wpływu na koncentrację  $\text{CO}_2$  (Ma i in. 2017). W związku z badaniami prowadzonymi nad użytkowaniem roślin C4 w produkcji biopaliw, dostępność N może mieć praktyczne znaczenie dla aklimatyzacji roślin C4 do niskich natężeń światła (LL) podczas wzrostu w klimacie umiarkowanym.

U roślin C3 kluczowy enzym fotosyntetyczny, Rubisco, stanowi około 30% zawartości N w liściach, natomiast u roślin C4 jest to 4-21% (Lawlor i in. 2001). Wydajność fotosyntezy, w przeliczeniu na jednostkę N, jest zwykle wyższa u roślin C4 niż C3 (Makino i in. 2003). Uważa się, że większa produkcja biomasy u roślin C4 niż C3 wynika z obecnego w komórkach otaczających wiązkę przewodzącą mechanizmu koncentracji  $\text{CO}_2$  i wysycenia  $\text{CO}_2$  Rubisco, który jest obecny tylko w tych komórkach. Pozwala to na wysokie natężenie wiązania  $\text{CO}_2$ , związane z wyeliminowaniem procesu fotoodychania. W konsekwencji, mniej N jest inwestowane w Rubisco i mniej enzymu potrzeba dla utrzymania wysokiego natężenia fotosyntezy (Ryc. 4). Zatem u roślin C4 zwiększona asymilacja  $\text{CO}_2$  w wysokim natężeniu światła i w wysokiej temperaturze powoduje zwiększenie, zarówno fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania N (PNUE, fotosynteza na jednostkę N w liściu), jak i liściowego wykorzystania wody (W – stosunek natężenia fotosyntezy

do natężenia transpiracji) w porównaniu z roślinami C3. Wzrasta się np. przy wzroście stężenia CO<sub>2</sub> i w warunkach stresu suszy – głównie na skutek przymykania aparatów szparkowych. Ponieważ specyficzność Rubisco względem CO<sub>2</sub> obniża się wraz ze wzrostem temperatury, różnica w wartości PNUE jest większa w wyższych temperaturach pomiędzy roślinami C3 i C4 (Long 1999). Czynniki środowiskowe, indukując zmiany w wykorzystaniu N przez rośliny (NUE, stosunek sucha masa do zawartość N w liściu) i/lub wykorzystaniu wody (WUE – stosunek sucha masa rośliny do ilości wytranspirowanej wody), mogą powodować zmiany w aktywności fotosyntetycznej roślin.



**Rycina 4.** Porównanie budżetu N w liściach roślin C3 i C4, zdeponowanego: w białkach rozpuszczalnych bez udziału Rubisco, w Rubisco, w tylakoidach oraz innych. Źródło: opracowanie własne na podstawie Ghannoum i in. 2011.

**Figure 4.** Comparison of leaf N budgets between C3 and C4 species. The contributions of soluble proteins without Rubisco, Rubisco, thylakoid N and other N. Modified (Ghannoum i in. 2011).

Rośliny aklimatyzują się do zmian środowiskowych na wielu poziomach. Aklimatyzacja do natężenia światła, temperatury, zawartości wody ma wpływ na dystrybucję N pomiędzy białkami uczestniczącymi w reakcjach świetlnych i ciemniowych fotosyntezy w taki sposób, że mogą one w różnym stopniu być limitowane czynnikami środowiskowymi. Zatem rośliny C4, w porównaniu z roślinami C3, powinny wytwarzać większą powierzchnię liści przy podobnym nakładzie N i mieć większą produktywność fotosyntetyczną. Rośliny C4 mogą również gromadzić N w systemie korzeniowym, co jest ważne w warunkach środowisk ubogich w związki mineralne. Ponadto, w warunkach ekstremalnych, mogą inwestować N w organy reprodukcyjne, w celu zachowania gatunku. Różnice pomiędzy NUE i WUE są

również widoczne pomiędzy podtypami roślin C4. U roślin podtypu NADP-ME – w porównaniu do NAD-ME, wartość NUE jest wysoka, ponieważ mają one mniej N w liściach i jest również wyższa wydajność katalityczna Rubisco. Trawy C4 mają wyższe natężenie fotosyntezy ( $P_n$ ) i szybszy wzrost liści na jednostkę N niż trawy C3 i rośliny dwuliścienne. Nie jest jasna zależność pomiędzy PNUE a wydajnością fotosyntetyczną roślin. Rośliny z wysokim współczynnikiem PNUE mogą mieć podobną zawartość N i większą wydajność fotosyntetyczną, niż mniej wydajne rośliny. Czynniki środowiskowe mogą obniżyć wiązanie C na jednostkę N, nawet w warunkach, kiedy jest wysoka wydajność fotosyntezy. Również wysoko wydajne rośliny mogą inwestować mniej N na jednostkę powierzchni liścia, ale więcej N może być wykorzystane w powstawaniu nowych liści i do wzrostu wydajności fotosyntetycznej. W warunkach ograniczonej zawartości N, wzrost jednego parametru wiąże się z obniżeniem innego. Większość badaczy traktuje wartości  $P_n/N$  jako indeks PNUE. Wartość  $P_n/N$  zależy od zawartości N. Dlatego porównywanie gatunków z różną jego zawartością może powodować błędy w wyznaczaniu wartości PNUE. Stwierdzono, że dla roślin adaptowanych do wysokich stężeń związków mineralnych w podłożu, natężenie fotosyntezy wzrasta znacznie ze wzrostem stężenia N – w porównaniu z roślinami przystosowanymi do niskich stężeń (Sage, Pearcy 1987). Niewiadomo, w jaki sposób zmiany te wpływają na rozmieszczenie N w liściu i oddziaływanie na fotosyntezę. Dystrybucja związków azotu w liściach roślin C3 i C4 różni się. Główna różnica w wykorzystaniu N przez rośliny C3 i C4 wiąże się z inwestowaniem N w Rubisco (Ryc. 4). Ponadto, rośliny C3 zwykle gromadzą w liściu 58% N w białkach rozpuszczalnych (w tym 1/3 w Rubisco) i 22% w białkach tylakoidów (Ghanoum i in. 2011). Natomiast rośliny C4 w rozpuszczalne białka inwestują 45% N, a w białka tylakoidowe – 28%. Znacznie zmienia się również zawartość chlorofilu w stosunku do N w liściu i wynosi około 5,0 i 3,5  $\text{mmol Chl}/\text{mol}^{-1}$  N, odpowiednio dla roślin: C4 i C3.

Różnice występujące pomiędzy roślinami C3 i C4, dotyczące wydajności wykorzystywania N, w dużym stopniu zależą od warunków wzrostu roślin i wydaje się, że geograficzne rozmieszczenie roślin nie jest w pełni związane z fizjologią fotosyntezy. Chociaż rośliny C4 stanowią zaledwie około 4% roślin na Ziemi, to ich udział w światowej produktywności wynosi ponad 20% (Lloyd, Farquhar 1994). Lepsze wykorzystanie N przez rośliny C4 jest ważne dla zwiększenia plonów, obecnie jednak jest więcej pytań niż odpowiedzi, jak można poprawić NUE u tej grupy roślin. Zmieniające się warunki środowiska rzadko umożliwiają utrzymanie w roślinach optymalnego stosunku C/N. Współzależności pomiędzy metabolizmem C i N stanowią zatem podstawowy warunek utrzymywania wysokiej aktywności fotosyntetycznej u roślin C4.

## 5. Podsumowanie

Zmiany środowiskowe, obniżające natężenie fotosyntezy, obniżają również wykorzystanie azotu przez rośliny. Aklimatyzacja roślin do zmieniających się czynników środowiskowych wiąże się zatem ze zmianą dystrybucji C i N pomiędzy organy, komórki i organelle komórkowe w taki sposób, by utrzymać homeostazę poszczególnych elementów.

### Literatura

- Allen J. F. 1992. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275–335.
- Becker T. W., Carrayol E., Hirel B. 2000. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. *Planta* 211: 800–806.
- Bloom A. J., Asensio J. S., Randall L., Rachmilevitch S., Cousins A. B., Eli A. C. 2012. CO<sub>2</sub> enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C3 but not C4 plants and slows growth under nitrate in C3 plants. *Ecology*: 93: 355–367.
- Bowman W. D. 1991. Effect of nitrogen nutrition on photosynthesis and growth in C4 *Panicum* Species. *Plant Cell Environ.* 14: 295–301.
- Champigny M. L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. 1995. *Photosynth. Res.* 46: 117–127
- Crawford N. M., Glass A. D. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 389–395.
- Foyer C. H., Champigny M. L., Valadier M. H., Ferrario S. 1994b. Partitioning of photosynthetic carbon: The role of nitrate activation of protein kinases. [W:] Sherry P, Haiford R, (red), *Proceeding of the Phytochemical Society of Europe*. Oxford University Press.
- Foyer C. H., Noctor G., Lelandais M., Lescure J.C., Valadier M. H., Boutin J. P., Horton P. 1994b. Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta* 192: 211–220.
- Ghannoum O., Evans J. R., von Caemmerer S. 2011. Nitrogen and water use efficiency of C4 Plants. [W:] Agepati S. Raghavendra, Rowan F. Sage (red), *C4 photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms*, Springer, 129–146.
- Howitt S. M., Udvardi M. K. 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *BBA Biomembranes*, 1465: 152–170.
- Khamis S., Lamaze T., Lemoine Y., Foyer C. H. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiol.* 94: 1436–1443.

- Kopriva S. 2011. Nitrogen and sulfur metabolism in C<sub>4</sub> plants. [W:] C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Raghavendra A. S., Sage R. F. (red), Springer, 109–128.
- Kopriva S., Koprivova A. 2005. Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C<sub>4</sub> plants. *Photosynth. Res.* 86: 363–372.
- Lawlor D. W., Lemaire G., Gastal F. 2001. Nitrogen, plant growth and crop yield. [W:] Lea P. J., Morot-Gaudry J-F. (red). *Plant nitrogen*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 343–367.
- Lillo C., Meyer C., Lea U. S., Provan F., Oltedal S. 2004. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.* 55: 1275–1282.
- Lloyd J., Farquhar G. D. 1994. <sup>13</sup>C discrimination during CO<sub>2</sub> assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99: 201–215.
- Long S. P. 1999. Environmental responses. [W:] Sage R. F., Monson R. K., (red). *C<sub>4</sub> plant biology*. San Diego, USA: Academic Press, 215–249.
- Ma J. Y., Sun W., Koteyeva K. N., Voznesenskaya E., Stutz S. S., Gandin A., Smith-Moritz A. M., Heazlewood J. L., Cousins. A. B. 2017. Influence of light and nitrogen on the photosynthetic efficiency in the C<sub>4</sub> plant *Miscanthus giganteus*. *Photosynth. Res.* 131: 1–13.
- Makino A., Sakuma H., Sudo E., Mae T. 2003. Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.* 44: 952–956.
- Mellor G. E., Tregunna E. B. 1971. The localization of nitrate-assimilating enzymes in leaves of plants with the C<sub>4</sub>-pathway of photosynthesis. *Can. J. Bot.* 49: 137–142.
- Melzer J. M., Kleinhofs A., Warner R. L. 1989. Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* 217: 341–346.
- Miller A. J., Fan X., Orsel M., Smith S. J., Wells D. M. 2007. Nitrate transport and signalling. *J. Exp. Bot.* 58: 2297–2306.
- Miller A. J., Cramer M. D. 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1–36.
- Mok D. W. S., Mok M. C. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 89–118.
- Oaks A. 1994. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Botany*, 72: 739–750.
- Pinto H., Powell J. R., Sharwood R. E., Tissue D. T., Ghannoum O. 2016. Variations in nitrogen use efficiency reflect the biochemical subtype while variations in water use efficiency reflect the evolutionary lineage of C<sub>4</sub> grasses at inter-glacial CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ.* 39: 514–526.
- Sage R. F., Pearcy R. W. 1987. The nitrogen use efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiol.* 84: 959–963.

- Schlüter U., Mascher M., Colmsee C., Scholz U., Bräutigam A., Fahnenstich H., Sonnewald U. 2012. Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* 160: 1384–1406.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W. R., Krapp A. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53: 959–997.
- Terashima I., Ooeda H., Fujita T., Oguchi R. 2016. Light environment within a leaf. Progress in the past one-third century. *J. Plant. Res.* 129: 353–363.
- Van Quy L., Champigny M. L. 1992. NO<sub>3</sub> enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiol.* 99: 344–347.





Magdalena **Chmur** / Andrzej **Bajguz**

Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Biologii  
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-254 Białystok

e-mail: abajguz@uwb.edu.pl

**Streszczenie:** Brassinosteroidy stanowią grupę steroidowych hormonów roślinnych, zidentyfikowanych u roślin okrytonasiennych, nagonasiennych oraz w glonach. Obecnie znane są 62 brassinosteroidy, których zróżnicowanie wynika z rodzaju i pozycji grup funkcyjnych w obrębie pierścienia cyklicznego A i B oraz łańcucha bocznego. Podstawą struktury chemicznej jest czteropierścieniowy szkielet  $5\alpha$ -cholestanu. Najbardziej aktywnym i najczęściej występującym u roślin przedstawicielem brassinosteroidów jest brassinolid i kastasteron.

Brassinosteroidy występują w ekstremalnie niskich stężeniach, około 1000 razy niższych w porównaniu do pozostałych fitohormonów (np. auksyn czy cytokinin), co jest istotnym czynnikiem wpływającym na sposób ich izolacji i analizę. W związku z tym, aby oznaczyć endogenny poziom brassinosteroidów w materiale roślinnym, istotne jest właściwe przygotowanie próbek do analiz. Wysoka czułość i wydajność metody gwarantuje detekcję brassinosteroidów z niewielkiej ilości liści lub korzeni, poniżej 20 mg. Brassinosteroidy są związkami silnie hydrofobowymi, nie wykazują jonowego charakteru, dlatego najczęściej do ich ekstrakcji używa się rozpuszczalników organicznych (np. metanol, acetonitryl). Kluczowym etapem izolacji brassinosteroidów jest oczyszczenie materiału roślinnego z barwników oraz białka z użyciem odpowiednich kolumn ekstrakcyjnych SPE (np. Discovery DPA-6S oraz Isolute C4 czy MAX i MCX). Oczyszczony materiał roślinny jest poddawany analizie za pomocą chromatografii cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią mas.

**Słowa kluczowe:** Brassinosteroidy, chromatografia, derywatyżacja, elucja, homogenizacja

## Extraction and purification of brassinosteroids from plant material

Magdalena **Chmur** / Andrzej **Bajguz**

University of Białystok, Faculty of Biology and Chemistry, Institute of Biology  
1J, Ciołkowskiego Street, 15-254 Białystok, Poland

e-mail: abajguz@uwb.edu.pl

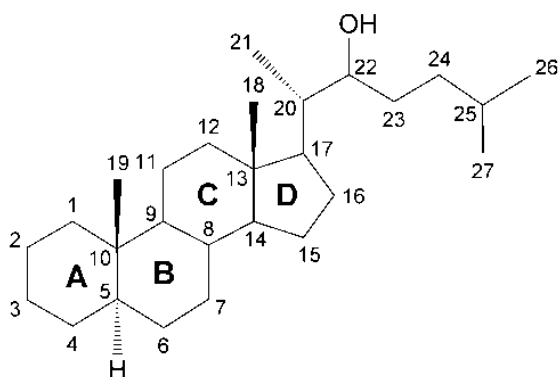
**Abstract:** Brassinosteroids make a group of steroid plant hormones identified mainly in angiosperms and algae. Currently 62 brassinosteroids are known and their differentiation results from the type and position of functional groups within the cyclic ring A and B and the side chain. The base of the chemical structure is a four-ring skeleton of  $5\alpha$ -cholestane. The brassinosteroids most active and most frequently met in plants are brassinolide and castasterone.

An extremely important factor affecting the method of isolation and analysis of brassinosteroids is their occurrence in extremely low concentrations, in the order 1000 times lower than that of other phytohormones, e.g. auxins or cytokinins. Therefore, to determine the endogenous level of brassinosteroids from plant material, it is important to properly prepare samples for analysis. The high sensitivity and efficiency of the method guarantees the detection of brassinosteroids from a small amount of leaves or roots, i.e. from less than 20 mg. Brassinosteroids are strongly hydrophobic compounds and do not have ionic character, so the most commonly used solvents for their extraction are organic solvents, e.g. methanol, acetonitrile. The key stage of brassinosteroids isolation is the purification of plant material from pigments and proteins using appropriate columns SPE, e.g. Discovery DPA-6S and Isolute C4 or MAX and MCX. The purified plant material is analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

**Keywords:** Brassinosteroids, chromatography, derivatization, elution, homogenization

## 1. Wstęp

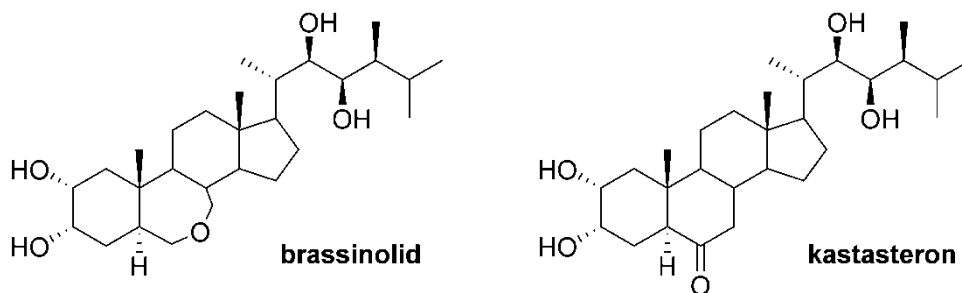
Brassinosteroidy (BR) stanowią grupę 62 zróżnicowanych pod względem budowy chemicznej hormonów roślinnych, zidentyfikowanych u roślin niższych i wyższych. Zróżnicowanie BR wynika z rodzaju i pozycji grup funkcyjnych w obrębie cząsteczki. Podstawą struktury chemicznej BR jest czteropierścieniowy szkielet 5 $\alpha$ -cholestanu (Ryc. 1) zbudowany z 7-oksalaktonowego, 6-ketonowego lub nieutlenionego cyklicznego pierścienia B, również cyklicznego pierścienia A, zawierającego grupy hydroksylowe (–OH) najczęściej w C-2 i C-3 pozycji węgla, oraz z łańcucha bocznego z grupami –OH zazwyczaj w pozycjach C-22 i C-23 (Bajguz, Tretyn 2003; Kanwar i in. 2017).



**Rycina 1.** Wzór strukturalny 5 $\alpha$ -cholestanu (Bajguz, Tretyn 2003)

**Figure 1.** Structure of 5 $\alpha$ -cholestan (Bajguz, Tretyn 2003)

Występowanie BR stwierdzono u wielu gatunków roślin niższych, takich jak: skrzyp polny, porostnica wielokształtna, czy też w glonach z rodziny *Chlorophyceae*, u roślin nagonasiennych z rodzaju *Cupressus* (cyprys) i *Pinus* (sosna) oraz u większości roślin okrytonasiennych – należących do rodziny *Fagaceae* (bukowate), *Apiaceae* (baldaszkowate), *Brassicaceae* (krzyżowe), *Fabaceae* (motylkowate) i innych (Bajguz, Tretyn 2003; Kanwar i in. 2017). Najbardziej aktywne i najczęściej występujące BR w roślinach to brassinolid i kastasteron (Ryc. 2).



**Rycina 2.** Wzory strukturalne wybranych brassinosteroidów (Kanwar i in. 2017)

**Figure 2.** Structures of selected brassinosteroids (Kanwar et al. 2017)

BR, na tle innych hormonów roślinnych, wyróżniają się dużym zróżnicowaniem pełnionych funkcji biologicznych oraz niskim stężeniem, około 1000 razy niższym w porównaniu do pozostałych fitohormonów, np. auksyn czy cytokinin (Ding i in. 2013). W komórce roślinnej BR pełnią rolę regulatorową w procesie podziałów komórkowych, wydłużania komórek, różnicowania naczyń, rozwoju reprodukcyjnego, kiełkowania nasion, kwitnienia, rozwoju pyłków, modulowania ekspresji genów, dojrzewania oraz starzenia się rośliny. BR znacznie poprawiają wydajność transpiracji oraz powodują zwiększenie zawartości chlorofili *a* i *b* oraz węglowodanów (Bajguz, Tretyn 2003; Hola 2011; Siddiqui i in. 2018; Tarkowska, Strnad 2018). Ponadto stwierdzono, że BR zwiększają odporność roślin na różnorodne stresy abiotyczne i biotyczne, takie jak: niedotlenienie, obecność metali ciężkich, susza fizjologiczna, stres solny oraz stres oksydacyjny, a także chronią roślinę przed atakami patogenów (Bajguz, Hayat 2009).

## 2. Metody ekstrakcji i izolacji brassinosteroidów z materiału roślinnego

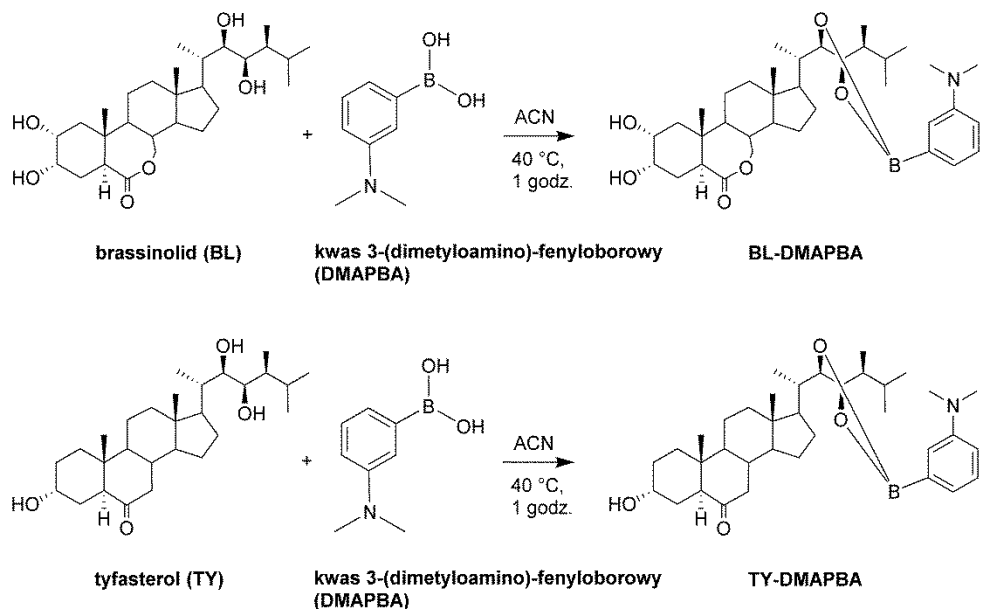
BR posiadają specyficzne właściwości biochemiczne, których znajomość jest niezbędna dla prawidłowego przeprowadzenia ich ekstrakcji oraz analiz. Hormony te są związkami silnie hydrofobowymi i niewykazującymi właściwości jonowych, a zatem najczęściej stosowanymi do ekstrakcji BR rozpuszczalnikami będą związkami organicznymi, takie jak metanol (MeOH) czy acetonitryl (ACN). Kolejnym czynnikiem determinującym sposób analizy BR jest ich aktywność biologiczna w niskich stężeniach: fg-pg/mg świeżej masy rośliny (Tarkowska, Strnad 2017). Następną

kwęstią utrudniającą analizę, jest obecność innych związków w ekstraktach powodujących zakłócenia w odczycie „sygnału” BR (Pan, Wang 2009). W związku z tym konieczne jest zastosowanie metod analitycznych, charakteryzujących się dużą czułością oraz wydajnością (Ding i in. 2013). Do wykrywania BR używane są różnorodne techniki analityczne, takie jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa – sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS), chromatografia cieczowa – sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) czy też ultrasprawną chromatografią cieczową –sprzężoną ze spektrometrią mas (UPLC-MS) (Kanwar i in. 2017).

W poprzednich latach procedura przygotowania prób oraz analiza endogennej zawartości BR u roślin znacznie różniła się w porównaniu do aktualnych technik. Około 40 g materiału roślinnego (liście lub korzenie) zamrażano w ciekłym azocie i rozcierano na drobny proszek w moździerzu. Roztarty materiał poddawano 2-krotnej ekstrakcji w mieszaninie MeOH-chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) (4:1) z dodatkiem wybranych wewnętrznych standardów BR. Ekstrakt suszono w próżni, po czym przemywano 3-krotnie  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CHCl}_3$ , a następnie ekstrakt przepuszczono przez kolumnę chromatograficzną Sep Pak Vac Silica (35 ml, Waters, Milford) i eluowano  $\text{CHCl}_3$ , po czym eluat przepuszczano przez kolumnę chromatograficzną Sephadex LH-20 i eluowano mieszaniną MeOH- $\text{CHCl}_3$  (4:1). Zebrany eluat poddano kolejnemu oczyszczaniu z wykorzystaniem kolumny Sep-Pak Plus  $\text{C}_{18}$  (Waters, Milford), zebrane frakcje oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC, a następnie derywatyzowano w celu analizy na GC-MS. Derywatyzacja BR polega na przekształceniu cząsteczki hormonu w lotne pochodne, w tym celu stosowano kwas metanoborowy i pirydynę (Kanwar i in. 2017). Badania prowadzone z zastosowaniem opisanej metody dostarczyły wiele cennych wyników, jednak metoda ta posiadała zasadniczą wadę, gdyż wymagała dużej ilości materiału roślinnego. Pozyskanie próbki 40g materiału roślinnego, w przypadku specyficznych mutantów, było niezwykle kłopotliwe, a przeprowadzając analizę w kilku powtórzeniach – bardzo ograniczone. Kolejnym problemem był fakt, iż tylko niektóre BR ulegały derywatyzacji z użyciem wyżej wymienionych odczynników, przez co identyfikacja wielu BR była w ówczesnych latach niemożliwa (Naguchi i in. 1999; Tarkowska i in. 2016).

Xin i in. (2013, 2016) opracowali ulepszoną metodę identyfikacji BR, redukując ilość materiału roślinnego niezbędnego do oznaczenia BR do 50 mg świeżej masy. Do ekstrakcji BR z materiału roślinnego, zamiast powszechnie stosowanych MeOH- $\text{CHCl}_3$  (4:1), badacze wykorzystali 95% MeOH, następnie do oczyszczenia ekstraktów z białek, chlorofilu oraz innych zanieczyszczeń zastosowali ekstrakcję na podłożu stałym (SPE) – kolumny MAX i MCX (6 ml, 500 mg). Pierwsza z nich

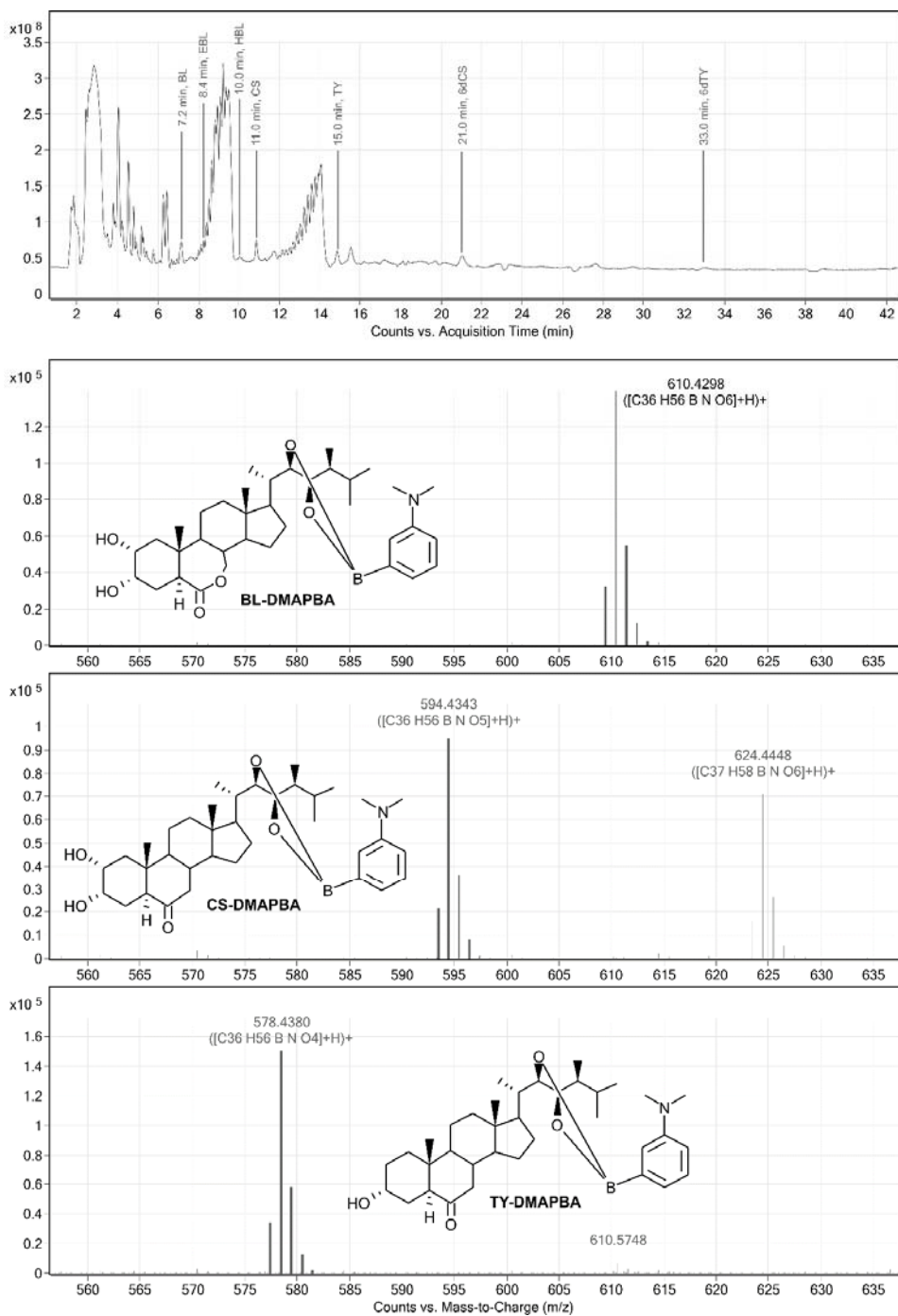
zatrzymuje związki o charakterze jonowym, natomiast przepuszcza niejonowe BR wraz z metanolem, natomiast kolumna MCX zatrzymuje BR na złożu, po przepłukaniu niskoprocetowym kwasem mrówkowym (FA), amoniakiem (NH<sub>4</sub>OH) i metanolem – pozbywa się hydrofilowych zanieczyszczeń, następnie BR są eluowane z kolumny za pomocą 80% MeOH. Do derywatywacji zastosowano kwas 3-(dimetyloamino)-fenyloborowy (DMAPBA). Związek ten reaguje z BR poprzez tworzenie z grupami hydroksylowymi C-22 i C-23 łańcucha bocznego (Ryc. 3) odpowiednich estrów DMAPBA.



**Rycina 3.** Reakcje brassinosteroidów z DMAPBA (Xin i in. 2013)

**Figure 3.** Reactions of brassinosteroids with DMAPBA (Xin et al. 2013)

Analizę zawartości BR przeprowadzono z zastosowaniem HPLC-QTOF/MS. Rozpuszczalnikami stanowiącymi fazę ruchomą był 0,05% (v/v) FA w wodzie (A) i 0,05% (v/v) FA w ACN (B) o następującym gradiencie: 0-2 min, 75% B; 2-14 min, 85% B; 14-40 min, 95% B; 40-42 min., 75% B; 42-45 min, 75% B (czas przepływu 1 ml/min). Zastosowano kolumnę Waters XBridge C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm, 3,5 μm), na którą nanoszono 10 μl mieszaniny. Po rozdeleniu składników mieszaniny i otrzymaniu ich widm masowych (Ryc. 4), można zidentyfikować poszczególne substancje za pomocą odpowiednich programów komputerowych (np. MassHunter).



**Rycina 4.** Chromatogram brassinosteroidów oraz ich widma masowe (dane nieopubl.)

**Figure 4.** Chromatogram of brassinosteroids and their mass spectra (unpubl. data)



Poniżej przedstawiono procedurę przygotowania prób roślinnych do analizy:

**1. Ekstrakcja z materiału roślinnego:**

- 1.1. Homogenizacja 50-100 mg liści lub korzeni za pomocą młynka kulowego lub roztrącenie w moździerzu w ciekłym azocie;
- 1.2. Dwukrotna ekstrakcja w 6,25 ml 95% (v/v) MeOH;
- 1.3. dodanie wewnętrznych standardów BR (2 ng/ml) w przypadku analizy ilościowej, w celu jakościowej analizy standardy nie są konieczne;
- 1.4. Mieszanie ekstraktu w ciągu 3-4 godzin;
- 1.5. Odwirowanie ekstraktu.

**2. Oczyszczenie materiału roślinnego z użyciem kolumny MAX:**

- 2.1. Aktywacja i równoważenie kolumny za pomocą 99,9% (v/v) MeOH, H<sub>2</sub>O, 1M KOH, 10% (v/v) MeOH i 95% (v/v) MeOH (10 ml);
- 2.2. Przepuszczenie ekstraktu przez kolumnę i zebranie go do szklanej próbówki;
- 2.3. Wysuszenie ekstraktu w strumieniu azotu (40°C);
- 2.4. ozpuszczenie wysuszonego ekstraktu w 4 ml 10% (v/v) MeOH.

**3. Oczyszczenie materiału roślinnego z użyciem kolumny MCX:**

- 3.1. Aktywacja i równoważenie kolumny za pomocą 99,9% (v/v) MeOH, H<sub>2</sub>O, 5% (v/v) FA i 10% (v/v) MeOH (10 ml);
- 3.2. Przepuszczenie przez kolumnę rozpuszczonego ekstraktu;
- 3.3. Przemycie kolumny 5% FA w 5% (v/v) MeOH, 5% (v/v) MeOH, 5% NH<sub>4</sub>OH w 5% (v/v) MeOH, 5% (v/v) MeOH (10 ml);
- 3.4. Elucja BR 80% (v/v) MeOH i zebranie eluatu;
- 3.5. Wsuszenie eluatu w strumieniu azotu;
- 3.6. Rozpuszczenie odparowanej próbki w 200 ml ACN oraz dodanie 30 µg DMAPBA;
- 3.7. Derywatyzacja prób przez 1 godzinę w temperaturze 40°C;
- 3.8. Przeniesienie do insertu (Xin i in. 2013).

Tarkowska i in. (2016) opracowali metodę oznaczania BR z tkanek roślinnych z zastosowaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC), gdzie granica wykrywalności BR sięga nawet 2 pg, dzięki czemu ilość materiału, niezbędna do przygotowania próbki, to jedynie 20 mg. Co najważniejsze, w metodzie tej nie jest wymagana derywatyzacja prób. Przygotowanie próbek do analiz opiera się na dwuetapowym oczyszczaniu ekstraktu przy użyciu kolumn SPE Discovery DPA-6S

i Isolute C4. Procedura przygotowania materiału do analizy na UHPLC-MS/MS przedstawia się następująco:

**1. Ekstrakcja materiału roślinnego:**

- 1.1. Homogenizacja 20 mg liści lub korzeni w ciekłym azocie;
- 1.2. Przeniesienie zhomogenizowanego materiału do probówek Eppendorf, dodanie 1 ml 60% (v/v) ACN oraz odpowiednie stężenie (2 ng/ml) znakowanych izotopowo wewnętrznych standardów BR;
- 1.3. Umieszczenie w probówkach dwóch metalowych kulek i homogenizacja próbek w młynku kulkowym z częstotliwością 30 Hz przez 3 minuty;
- 1.4. Przeniesienie ekstraktu do kolbek i wytrząsanie przy 17 obrotów/min. w temperaturze 4°C przez 16 godzin;
- 1.5. Odwirowanie prób i przeniesienie supernatantu do probówek ze szkła borokrzemianowego.

**2. Oczyszczenie materiału roślinnego z użyciem kolumny Discovery DPA-6S:**

- 2.1. Aktywacja i równoważenie kolumny za pomocą 1 ml 100% (v/v) MeOH oraz 60% (v/v) ACN (10 ml);
- 2.2. Przepuszczenie supernatantu przez kolumnę i zebranie do czystej szklanej probówki;
- 2.3. Odparowanie supernatantu do sucha przy użyciu koncentratora próżniowego;
- 2.4. Rozpuszczenie próbki w 100 µl 100% (v/v) MeOH i 900 µl wody destylowanej (stopień czystości LC-MS).

**3. Oczyszczenie materiału roślinnego z użyciem kolumny Isolute C4:**

- 3.1. Aktywacja kolumny poprzez przepuszczenie przez nią 1 ml 100% (v/v) MeOH oraz 1 ml 10% (v/v) MeOH (10 ml);
- 3.2. Przepuszczenie rozpuszczonej próbki przez kolumnę;
- 3.3. Przemycie kolumny 1 ml 10% (v/v) MeOH;
- 3.4. Elucja BR z kolumny za pomocą 1 ml 100% (v/v) MeOH, zebranie eluatu;
- 3.5. Odparowanie eluatu do sucha w koncentratorze próżniowym;
- 3.6. Rozpuszczenie odparowanej próbki w MeOH lub ACN i przeniesienie do insertu (Tarkowska i in. 2016).

### 3. Podsumowanie

W niniejszym rozdziale przedstawione zostały metody ekstrakcji i izolacji BR z materiału roślinnego, w oparciu o ich homogenizację oraz oczyszczanie przy użyciu kolumn chromatograficznych. Gotowe ekstrakty poddawane są analizie z zastosowaniem różnorodnych technik chromatograficznych. Nowoczesne metody oczyszczania materiału z białek, chlorofili i innych zanieczyszczeń oraz zastosowanie technik detekcji BR, bazujących na chromatografii cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią mas, pozwalają na zmniejszenie zużycia materiału do 20 mg – w porównaniu do metod stosowanych kilkanaście lat temu (Tarkowska, Strnad 2017).

#### Literatura

- Bajguz A., Tretyn A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62: 1027–1046.
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47: 1–8.
- Ding J., Mao L. J., Wang S. T., Yuan B. F., Feng Y. Q., 2013. Determination of endogenous brassinosteroids in plant tissues using solid-phase extraction with double layered cartridge followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, 24: 386–394.
- Hola D. 2011. Brassinosteroids and photosynthesis. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Wyd. Springer, str. 143–192.
- Kanwar M. K., Bajguz A., Zhou J., Bhardwaj R., 2017. Analysis of brassinosteroids in plants. *J. Plant Growth Regul.*, 36: 1002–1030.
- Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E. 1999. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol.*, 121: 743–752.
- Pan X., Wang X. 2009. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 877: 2806–2813.
- Siddiqui H., Hayat S., Bajguz A. 2018. Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. *Acta Physiol. Plant.*, 40: 59.
- Tarkowska D., Novák O., Oklestkova J., Strnad M. 2016. The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408: 6799–6812.
- Tarkowska D., Strnad M. 2017. Protocol for extraction and isolation of brassinosteroids from plant tissues. [W:] Russinova E., Cano-Delgado A.I. (red.) *Brassinosteroids: Methods and Protocols*. Wyd. Springer, str. 1–6.

- Tarkowská D., Strnad M. 2018. Isoprenoid-derived plant signaling molecules: biosynthesis and biological importance. *Planta*, 247: 1051–1066.
- Xin P., Yan J., Fan J., Chu J., Yan C. 2013. An improved simplified high-sensitivity quantification method for determining brassinosteroids in different tissues of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 162: 2056–2066.



Grażyna Łaska / Aneta Szymajda

Białystok University of Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering  
Department of Agri-Food Engineering and Environmental Management  
45A, Wiejska Street, 15-351 Białystok, Poland

e-mail: g.laska@pb.edu.pl

**Abstract:** At present in Poland, biomass has the largest technological potential as a biofuel, estimated at 684.6 PJ a year, of which 407.5 PJ – falls on solid biofuels. Its reserves include surplus biomass obtained in agriculture (195 PJ), forestry (101 PJ), fruit farming (57.6 PJ) and wood waste (53.9 PJ). The aim of the study is to evaluate the combustion of cow dung biomass for energy production purpose. The paper compares biomass combustion parameters in terms of total moisture, total carbon, total sulfur, hydrogen content, ash and its calorific value. The process of cow dung biomass burning requires optimization taking into account different ways of its harvesting, storage, drying and various ways of feeding cattle in different seasons of the year.

Biomass of animal origin is primarily solid animal waste (manure) and liquid animal waste (slurry). Cow dung contains 1.8–2.4% nitrogen (N), 1.0–1.2 phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 0.6–0.8% potassium (K<sub>2</sub>O) and from 50–75% organic humus. In many countries in the world, cow dung is used as a fertilizer, fuel, thermal insulator and building material. Cow dung contains 55–65% of methane and 30–35% of carbon dioxide. Produced by one cow during the year and converted into methane, is equivalent to over 50 liters of gasoline. In the energy balance, the calorific value of this fuel is from 10,000 to over 17,000 kJ/kg, and the amount of heat released during the total combustion of 10 kg cow dung/h is about 38.3 kW.

**Keywords:** renewable energy, solid fuels, cow excrement, biomass burning parameters, energy value

## 1. Introduction

In recent decades, the future of energy production has been intensely discussed at world science forums. On the one hand, the reason is the growing demand for energy, and on the other hand, the need to stop or drastically reduce gas emissions linked to the global warming (Rybak 2006). An additional factor motivating intensive research in the field of energy production is increasing depletion of limited fossil fuel resources (coal, oil, natural gas) (Ney 2004). The problem is the cost of obtaining them and the current level of technology development enabling their use. Despite the ongoing technological revolution, the use of resources is disproportionately small compared to the latent potential in them. Renewable energy is obtained from recurring natural processes, so the resources are constantly complemented and can be treated as an inexhaustible source of energy (GUS 2014a).

The current energy policy of Poland, consistent with the European Union's directions, aims to replace the energy obtained from fossil fuels with that from renewable sources, including biomass. Renewable energy sources have many advantages, they are, among others, environmentally friendly, inexhaustible, generally available and cheap (Gendka 2016). According to the Regulation of the Minister of Economy, Labor and Social Policy dated on 9 May 2004, on the specific scope of the obligation to purchase electricity and heat from renewable energy sources, biomass are substances of vegetable origin, biodegradable, derived from products, waste and residues from agricultural and forestry production, as well as from the processing industry and parts of other biodegradable waste (Journal of Law 2004, No 267, item 2655, 2656). Biomass of animal origin is solid animal waste (manure) and liquid animal waste (slurry) (Roszkowski 2013). Solid biofuels are among the most important energy sources. The energy use of solid biofuels can significantly help Poland and other EU countries to achieve the objectives of increasing the share of renewable sources in energy production, reducing pollutant emissions, including CO<sub>2</sub>, ensuring energy security and creating a free market for fuels and energy (Rybak 2006). Therefore, the aim of this work is to evaluate the combustion of cow dung biomass for energy production purposes and its optimization taking into account various criteria, methods of acquisition, storage and combustion.

## 2. Study object

The subject of the research is cow dung solid biomass. Energy stored in animal waste is released during the combustion process and used for the production of biogas and heat (Alfa et al. 2014; Zahid, Surindra 2017). In India, the combustion of animal manure on a mass scale is a source of electricity (Sfez et al. 2017). Dried feces are also used as fuel in fires and ovens. The benefits of cow dung are significant (Sharvav, Shende 2006; Bhattacharjya, Yu 2014). Cow droppings are used to level the walls of rustic houses, because it is a very good and cheap insulator (Tanmoy et al. 2014). Therefore, it is also used for lining floors and walls and additionally used as an insect repellent.

Agricultural activity in recent years has been producing large amounts of animal waste in many parts of the world. In the USA, the main source of fertilizers is the breeding and using waste of cows, beef cattle, poultry and pigs. Beef cattle industry produces about 24.4 million tons of fertilizer per year, cattle breeding 19 million tons manure, poultry 12.7 million tons of litter and manure, and pig production produces manure equivalent for 14.5 million tons (<http://www.wood-pellet-machinery.com/FAQ/116.html>).

In Poland, the number of cattle is increasing each year. In the Podlasie voivodship, in 2016 about 960,000 cattle were bred and this number grew from 895,000 in 2011 (Tab. 1).

**Table 1.** Changes in the number of cattle in Poland and the Podlasie voivodship, in 2011–2016

Species of animals: cattle	2011	2012	2013	2014	2015	2016
	art	art	art	art	art	art
in Poland	5 500936	5 520345	5 589543	5 660271	5 762534	5 970214
in the Podlasie	895 052	881 972	930 818	938 709	952 377	959 788

Source: [www.stat.gov.pl](http://www.stat.gov.pl).

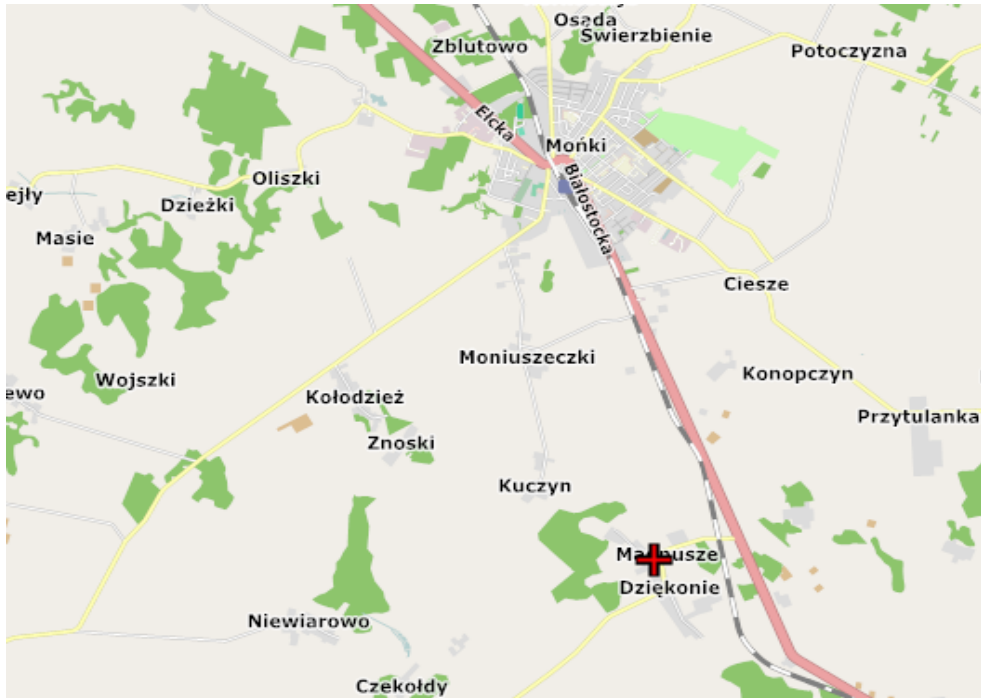
Only some of the by-products of agricultural activity can be used as fertilizers. Their excess causes pollution of the environment, but is also wastage of these resources. One option is to use manure as a direct or indirect source of fuel for a wide range of thermal applications, such as boilers and stoves (Bębenek 2008).

The reason why cow dung can be used as fuel is that cows eat a variety of foods such as grass, leaves, grains, wheat stalks and thoroughly chew food. Their manure therefore consists of many flammable fibers. It therefore has excellent



properties, requires a short time to collect and is easily available. Cow dung contains a large amount of energy for use as a sustainable and renewable source, which contributes to the conservation of resources and better use of the so-called organic waste (Kartikey et al. 2016).

The cow dung solid biomass for our research was obtained from a private farm located in the village of Dziękonie in the municipality of Mońki, in the Podlasie Voivodeship, 40 km north-west of Białystok (Fig. 1). It is a village of typically agricultural character, where cow manure is one of the by-products of agricultural activity and is used as the main component of natural fertilizers.



**Figure 1.** Location of the cow dung biomass harvest in Dziękonie

Source: <https://monki.geoportal2.pl/>

### 3. Source materials

One of the thermal energy resources that is widely used there are dried feces of domestic animals (cattle). The techniques of collecting animal biomass, the method of its storage, the properties of furnaces and the properties of slurry have been studied in India (Vankát et al. 2009). Biomass combustion experiments were also

performed in the Czech Republic. They included analysis of fuel properties: calorific values, volatile combustible properties, ash properties and elemental analysis (C, H, N, S, O, Cl).

In the Białystok Heat and Power Plant (Tab. 2) the process of combustion of different types of biomass (energy willow, woodchips and sunflower husk pellets) was analyzed and characterized. In the comparative analysis of the combustion process parameters, total and analytical moisture content, total carbon, total sulfur, hydrogen content, ash, combustion heat and calculated calorific value were determined (Tab. 2). These tests were performed on the basis of Polish Standards and Technical Procedures of the Institute for Chemical Processing of Coal. It was found that in terms of energy parameters cow dung biomass can be a substitute for classic biofuels used as a renewable energy source.

**Table 2.** Parameters of biomass combustion of plant origin

Tagged parameter	Values from energy willow	The value of wood chips	Sunflower peel pellets
Total moisture content	43%	46.3%	7.9%
Analytical moisture content	6.8%	6.1%	7.3%
Total carbon content	46.24%	47.92%	47.78%
Total sulfur content	0.05%	0.02%	0.12%
Hydrogen content	5.17%	6.36%	5.63%
Ash content	5.3%	2.2%	2.6%
The calorific value	9.22 MJ/kg	9.09 MJ/kg	17.16 MJ/kg

Source: Białystok Power Plant 2016.

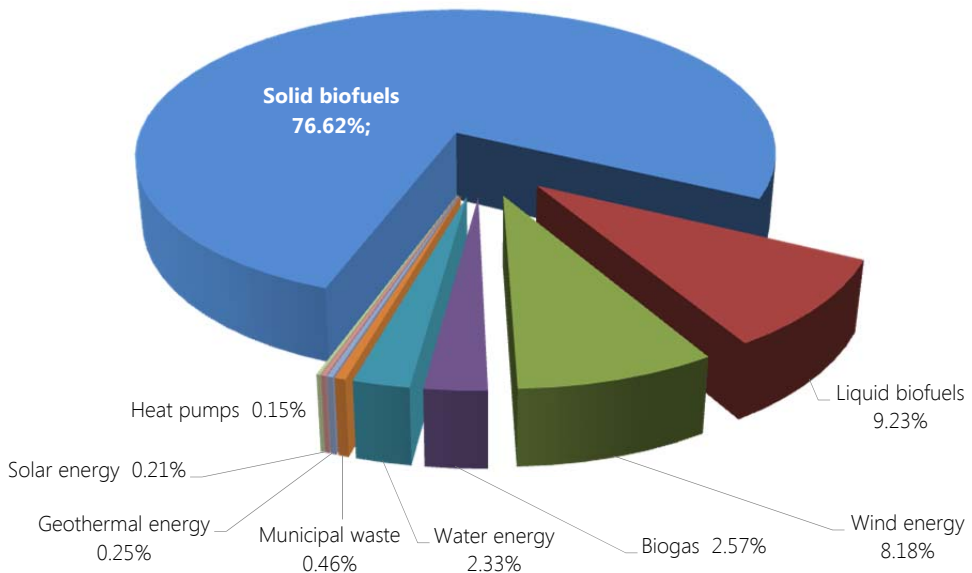
#### 4. Biomass combustion as a way of obtaining energy

Combustion of biomass is the most common and the simplest way of producing thermal energy and electricity. Combustion process generates as much as 90% of the energy obtained in the world from biomass, whereby biomass can be burned in all states of matter.

The type of combusted biomass has a significant influence on the choice of combustion technology. Biomass intended for energy purposes is classified according to (Dreszer et al. 2003; Kowalczyk-Juśko 2010; Kuś, Faber 2010):

- a) origin:
  - forest biomass (dendromass),

- biomass of agricultural origin (agromass),
  - animal waste (zoomass),
- b) state of aggregation:
- solid biomass (forest and plant biomass),
  - biomass in the gas state (biogas),
  - biomass in the liquid state (biofuels),
- c) the degree of processing:
- primary (wood, straw, energy plants)
  - secondary (slurry, sewage sludge, manure),
  - processed (biogas, bioethanol, rapeseed oil esters),
- d) production waste:
- agricultural (straw, hay, branches from orchards),
  - animal (derived from the slaughter of animals),
  - forestry (residues originating from the wood-biomass processing industry),
  - industrial (pulp, brewers' pomace, production waste from potato processing, etc.)



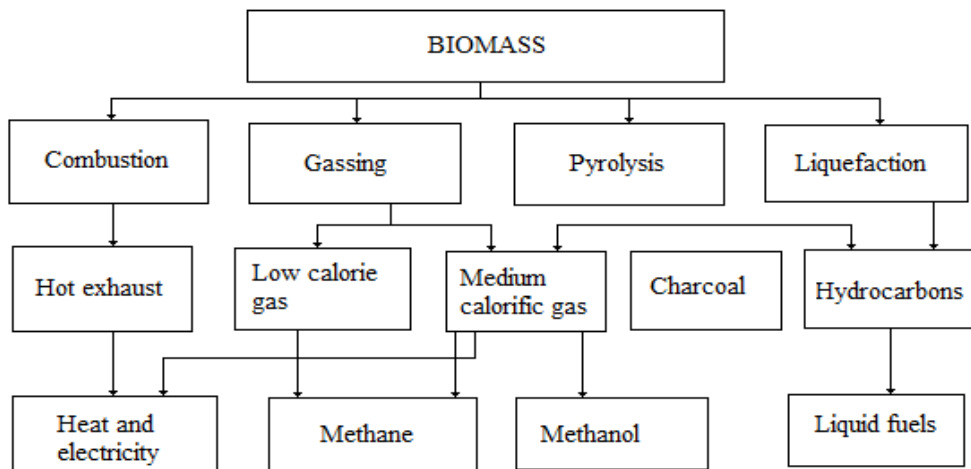
**Figure 2.** Raising energy from renewable sources by media in Poland in 2014

Source: GUS 2014b.

Forest biomass includes harvested firewood, wood chips from chip residues. It does not include biomass made of high-quality wood. The need to save wood of

good quality for processing, for example in the furniture industry, creates the need for alternative harvesting of wood biomass from plants grown on agricultural land, e.g. trees and shrubs (willow, poplar, polio rose), grasses (gigantic, sugar or Chinese Miscanthus), perennials (syllabus, Jerusalem artichoke). Obtaining energy from renewable sources in Poland results primarily from the geographical conditions and resources available for development that are characteristic of our country. The energy obtained from renewable sources in Poland comes mainly from solid biofuels (77%) and from liquid biofuels (9%), from wind energy (8%) and from biogas (26%) and water (2.3%) (Fig. 2).

Biomass is treated by three groups of processes: physical, thermochemical and biological (Gołek 2010). Today, there are four biomass processing technologies (Fig. 3). It is combustion, gasification, pyrolysis and liquefaction. In this work attention is paid to biomass combustion technology. Combustion is a chemical reaction associated with the release of significant amounts of heat and light. The combustion process requires an adequate amount of oxygen supplied with the air. Its amount depends on the weight and type of raw material. Fuel and air are called substrates, while exhaust fumes and solid fuel residues (ash and slag) are the by-products of combustion.



**Figure 3.** Technologies, intermediate and final products of thermochemical conversion of biomass

Source: Głodek 2010.

The chemical and physical composition of a combusted substance is the most important information determining its suitability as a fuel. The basic information about the fuel composition is the type and amount of elements subject to combus-

tion. Meeting the conditions of good mixing of fuel with air and the right temperature in the furnace ensures proper combustion. The greater the inhomogeneity of the fuel and the poorer its quality, the more sophisticated the combustion system is needed (Gołek 2010).

Combustion installations can be used to utilize various types of biomass, including cow dung. Combustion of biomass energy-efficient, economically and ecologically requires the use of appropriate technologies. The specific physical and chemical properties of biomass require the use of appropriate technological solutions, adapted to the fuel. Only 20% of the mass of wood is made of non-volatile carbon compounds that are burned on a grate in a traditional boiler (in brown coal they constitute 45–60%, in hard coal 60–80%, in coke – over 95%). The rest, about 80%, are volatile compounds that burn over the grate, emitting intensely in a relatively narrow temperature range. Effective combustion of this type of fuels requires special techniques and boilers that provide the dynamic and thermal conditions necessary for the complete combustion of volatile biomass thermal decomposition products. Inadequate apparatus and technological solutions result in increased, often to serious levels, emission of harmful substances into the atmosphere, which may destroy the beneficial ecological effect resulting from the nature of wood biomass. Incomplete combustion is also an economically disadvantageous reduction in the efficiency of the process. Boilers for biomass burning are available in a wide range of power from a dozen kW to several hundred MW. A typical furnace consists of a combustion chamber usually lined with a heat-resistant ceramic material and grate. The structural solutions of the grates include fixed grids, flat and stepped mechanical grates. For burning of dried fuels (20–25%), boilers with fixed or horizontal mechanical grates are used. In the case of moist fuels (40–60%), the boilers are equipped with movable step grates. Such a system ensures in the first phase evaporation of water from fuel, and then as it moves into the hearth of its combustion. Boilers equipped with fluidized bed furnaces are also used. Fluidized-bed boilers allow efficient combustion of low-quality biofuels (humid) while maintaining low-emission emissions. Boilers for biomass combustion can be equipped with automated and forced air supply. The feeding systems are usually screw and pneumatic conveyors cooperating with moving floor scrapers.

## 5. Comparison of combustion parameters of biomass of animal and vegetable origin and the effect of combustion on used boilers

Modeling of the biomass combustion process in the boiler needs considering the physical and chemical phenomena occurring there (Wis, Matwiejew 2005).

In the process of fuel combustion, ash and its quantity play a crucial role. High content of alkali and chemically aggressive chlorine can cause corrosion of power equipment and formation of deposits on heating surfaces of the boiler (Grabke et al. 1995). In the studies conducted in India and the Czech Republic it has been found that the ash content in animal faeces ranged from 11.62% to 32.16% (Tab. 3), and this is a much higher value than in biomass of plant origin (2.2–5.3%) (Tab. 2). Therefore, an important element is the determination of the chemical composition of ash, specifically the presence of fusible alkali metal oxides. Ash from biomass is often liquid already at 800°C and melts at much lower temperatures than coal ash. This may be one of the causes of sintering and agglomeration of ashes leading to defluidization of the fluidized bed (Rybak 2006). The ash softening temperature for animal faeces is in the range from 1110 to 1170°C, while the melting point is from 1130 to 1200°C (Tab. 3). In a simple experiment of the cow dung combustion process, the exhaust gas temperatures between 900 and 1200°C were achieved.

High temperature corrosion occurs in boilers always, but under normal operating conditions the rate of metal depletion is 8–10 nm/h, which allows failure-free ten-year operation of the boiler (Golec 2004). It has been shown that cow dung contains chlorine in the concentration ranging from 0.1–0.27% (Tab. 3), which may be a corrosion hazard, which indicates that the combustion temperature needs to be optimized in the range of boilers and fluidized bed. The content of total carbon, hydrogen and sulfur in the cow dung biomass is similar to content of total carbon of willow, sunflower hull and woodchips.

The next analyzed parameter is moisture. It is important not only as a factor determining the heating value and emission of pollutants, but also in relation to the combustion technology, transport, storage, automation of feeding to the boiler and conditions of its exploitation (Głodek 2010). The energy value of a solid biofuel increases with the decrease in moisture (Tab. 2). The drier the biofuel, the less energy is needed to evaporate the water in the combustion process. It has been found that the initial moisture content in cow dung is about 40%. Due to the characteristic structure of animal manure, a drying process should be applied before

feeding it to the boiler (Parsamehr, Nilsson 2012). Drying is the process in which the water content in the materials is reduced, both the free water present on the surface, as well as the moisture content inside.

**Table 3.** Parameters of combustion of animal manure (Source: Vankát et al. 2009)

Animal	Vyskov (India) <sup>4</sup>	Himalaya (India) <sup>4</sup>	Himalaya (India) <sup>4</sup>	Chomutov (Czech Republic) <sup>4</sup>	Prague (Czech Republic) <sup>4</sup>	Own research December 2017 (Poland)	Own research January 2018 (Poland)
Analytical moisture (%)	2.6	4.36	5.17	4.86	4.62	2.7	5.3
Volatile combustible matter (%)	67.17	52.8	50.77	61.89	67.32	-	-
Non-Volatile combustible matter (%)	18.61	11.68	11.87	11.57	7.99	-	-
Ashes (%)	11.62	31.16	32.19	21.68	20.07	10.7	13.1
C (%)	42.87	32.52	29.89	39.79	41.14	46.10	43.63
H (%)	5.69	3.85	3.43	5.48	4.97	5.41	5.10
N (%)	1.6	1.84	2.21	1.13	0.9	-	-
S (%)	0.18	0.18	0.2	0.13	0.19	0.26	0.28
O (%)	35.44	26.09	26.91	26.93	28.11	-	-
Cl (%)	0.14	0.2	0.27	0.1	0.14	-	-
Higher calorific value (MJ·kg <sup>-1</sup> )	17.59	13.41	11.95	15.72	16.31	18.84	17.44
Lower calorific value (MJ·kg <sup>-1</sup> )	16.29	12.47	11.08	14.41	15.12	17.57	16.17
Ash:							
Temperature of softening (°C)	1110	1120	1130	1170	1120	-	-
Temperature of melting (°C)	1160	1130	1150	1200	1160	-	-
Temperature of flow (°C)	1210	1140	1160	1230	1170	-	-
Total moisture (%)	-	-	-	-	-	87	85

The calorific value of all types of biomass depends strictly on its moisture (Tab. 3). It ranges from 6 to 8 MJ/kg for biomass with moisture 50–60% to 15–17

MJ/kg for dried biomass, moisture of which is 10–20% (Grzybek 2003). The energy value of cow dung biomass is similar to the energy value of biomass of vegetable origin which ranges from 11.08 MJ/kg to 17.57 MJ/kg (Tab. 3). It has been confirmed that moisture content significantly reduces the qualitative energy parameter of fuel (Tab. 2–3). The lower the moisture content in the feces, the higher the calorific value.

Theoretically, it depends mainly on the degree of coalification of the combusted material, i.e. on its chemical composition, which makes it possible to determine the calorific value on the basis of the content of combustible elements in its composition (Mółka, Łapczyńska-Kordon 2011). Moisture content also varies with the year seasons.

In our own research it was found that the moisture content of the biomass burned also affects its calorific value. In the sample with a lower content of analytical moisture – the calorific value of the cow dung type of biomass is higher (17.57 MJ · kg<sup>-1</sup>). In the sample with a higher analytical moisture content – the biomass heating value is lower (16.17 MJ · kg<sup>-1</sup>). The obtained calorific value of cow dung biomass is similar to their values determined in research from India and the Czech Republic (Tab. 3).

## 6. Conclusion

The renewable energy production market was established in Poland in 2005, and the impulse for its activation was imposed on Poland by the European Union obligation to produce an annual increase in energy based on renewable sources (from 3.1% in 2005 to 14% in 2020). The power plants have made significant investments with their own funds, taking long-term bank loans and using EU funds. To support the development of renewable energy, in 2005, the so-called a system of green certificates, which allowed compensation for the increased costs of green energy compared to conventional ones was introduced. The sharp decline in the value of green certificates, which took place at the beginning of 2013 and their continued low level, does not allow for the compensation of costs of energy production from renewable energy sources. At this point, green certificates are 10 times cheaper than they were at the beginning of 2005. This phenomenon resulted in the cessation or significant reduction of biomass reception by energy concerns.

There is a need to look for new, alternative and generally available heating materials, which will have a low, competitive price, and at the same time a high energy value. The answer to this is the cow dung type biomass. This biomass is an



alternative energy source due to its energetic properties, which can be successfully used in Polish power plants and heat and power plants. The tests confirmed its suitability for this purpose. However, it is difficult to transport, store and use in its original form. To facilitate transport and minimize costs, it is necessary to reduce the volume of manure by compressing it to a briquette (moisture content 6–8%) or pellet (moisture content 7–12%), which are easy to store.

Boilers in Polish power plants are adapted to biomass combustion, but there is no data on the subject of biomass of cow dung type in Polish literature. Is it suitable for burning in existing installations, or should special boilers be designed that take into account its properties confirmed by physico-chemical tests? The research begun in the field of optimization of the entire cow dung biomass burning process in the coming years will bring answers to these questions.

## Acknowledgments

This study was supported by a grant nr S/WBiIŚ/5/16 from the Ministry of Science and Higher Education of Poland.

## References

- Alfa I. M., Dahunsi S. O., Iorhemen O. T., Okafor C. C., Ajayi S. A. 2014. Comparative evaluation of biogas production from Poultry droppings, Cow dung and Lemon grass. *Bioresource Technol.*, 157: 270–277.
- Bębenek Z. 2008. Biopaliwa stałe w odnawialne i niekonwencjonalne źródła energii. Poradnik. Wydawnictwo Tarbonus, Kraków.
- Bhattacharjya D., Yu J-S. 2014. Activated carbon made from cow dung as electrode material for electrochemical double layer capacitor. *J. P. Sources*, 262: 224–232.
- Białystok Power Plant*. 2016 (Elektrociepłownia Białystok. 2016. Dane źródłowe – Parametry spalania biomasy pochodzenia roślinnego).
- Dreszer K., Michałek R., Roszkowski A. 2003. Energia odnawialna – możliwości jej pozyskiwania i wykorzystania w rolnictwie. PTIR, Kraków – Lublin – Warszawa.
- Gendka A. 2016. Problemy gospodarki energią i środowiskiem w rolnictwie, leśnictwie i przemyśle spożywczym. NFOŚiGW, Warszawa.
- Głodek E. 2010. Spalanie i współspalanie biomasy. Przewodnik. Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Opole.
- Zasady metodyczne badań statystycznych z zakresu energii ze źródeł odnawialnych* 2014a. Główny Urząd Statystyczny. Warszawa.
- Notatka informacyjna Energia ze źródeł odnawialnych w 2014 r.* 2014b. Główny Urząd Statystyczny. Warszawa.

- Golec T. 2004. Współspalanie biomasy w kotłach energetycznych. *Energetyka i Ekologia*, 7: 437–445.
- Grabke H. J., Reese E., Spiegel M. 1995. The effect of chlorides, hydrogen chloride and sulfur dioxide in the oxidation of steels below deposits. *Corros. Sci.*, 37: 1023–1043.
- Grzybek A. 2003. Kierunki zagospodarowania biomasy na cele energetyczne, *Więś Jutra*, 9: 10–11.
- Journal of Laws 2004, no. 267, item 2655, 2656 (Dziennik Ustaw Nr 267 poz. 2655, 2656. Ustawa z dnia 9 grudnia 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu obowiązku zakupu energii elektrycznej i ciepła wytworzonych z odnawialnych źródeł energii).
- Kartikey G., Kamal A., Deepanshu R. 2016. Current status of cow dung as a bioresource for sustainable development. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1): 1–11.
- Kowalczyk-Juśko A. 2010. Metodyka szacowania regionalnych zasobów biomasy na cele energetyczne. *Zeszyty Naukowe SGGW – Ekonomia i Organizacja Gospodarki Żywnościowej*, 85: 103–116.
- Kuś J., Faber A. 2010. Produkcja roślinna na cele energetyczne a racjonalne wykorzystanie rolniczej przestrzeni produkcyjnej Polski. *Mat. I Kongresu Nauk Rolniczych Nauka-Praktyce*. IUNG, Puławy: 63–77.
- Mółka J., Łapczyńska-Kordon B. 2011. Właściwości energetyczne wybranych gatunków biomasy. *Inżynieria Rolnicza*, 15(6): 141–147.
- Ney R. 2004. Efektywność wykorzystania energii ważnym zadaniem polityki energetycznej. *Polityka Energetyczna*, 8: 11–24.
- Parsamehr M., Nilsson N. 2012. Heat generation by cow dung incineration in the north of Iran. *Environmental Engineering Department*. Mid Sweden University, Sundsvall.
- Roszkowski A. 2013. Energia z biomasy – efektywność, sprawność i przydatność energetyczna. *Cz. 1. Problemy Inżynierii Rolniczej*, 1(79): 97–124.
- Rybak W. 2006. Spalanie i współspalanie paliw stałych. *Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej*, Wrocław.
- Sfez, S., De Meester S., Dewulf J. 2017. Co-digestion of rice straw and cow dung to supply cooking fuel and fertilizers in rural India: Impact on human health, resource flows and climate change. *Sci. Total Environ.*, 609: 1600–1615.
- Sharvav K. J., Shende D. 2006. Combustion of cow dung in fluidized state for household purposes. *Advances in Energy Research*, IIT Bombay.
- Tanmoy K., Indira S., Ranjit K., Sampa D., Boruah, R. K., Amrit K., Dilip K. 2014. Composting of cow dung and crop residues using termite mounds as bulking agent. *Biore-source Technol.*, 169: 731–741.
- Wisł J., Matwiejew A. 2005. Biomasa – badania w laboratorium w aspekcie przydatności do energetycznego spalania, *Energetyka*, 9: 631–636.
- Vankát A., Krepl V., Kára J. 2009. Animal dung as a source of energy in remote areas of indian Himalayas. *Agricult. Tropica et Subtropica*, 43(2): 140.

Zahid G. R., Surindra S. 2017. Anaerobic digestion of activated sludge, anaerobic granular sludge and cow dung with food waste for enhanced methane production. J Clean. Prod., 164: 557–566.

[www.monki.geoportal2.pl](http://www.monki.geoportal2.pl).

[www.stat.gov.pl](http://www.stat.gov.pl).

[www.wood-pellet-machinery.com/FAQ/116.html](http://www.wood-pellet-machinery.com/FAQ/116.html).

## Zmiany zachodzące w strukturach zbiorowisk grzybów *micromycetes* zasiedlających murszejącą glebę w dolinie rzeki Supraśl

Zofia Tyszkiewicz

Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska  
Katedra Inżynierii Rolno-Spożywczej i Kształtowania Środowiska  
ul. Wiejska 45a, 15-349 Białystok

e-mail: z.tyszkiewicz@pb.edu.pl

**Streszczenie:** Badaniami objęto utwory organiczne tworzące glebę należącą do podtypu gleb organicznych limno-murszowych. Punkt badawczy znajdował się w dolinie Supraśli na zmeliorowanych, aktualnie nieużytkowanych łąkach. Wybrany fragment doliny położony był na obszarze gminy Wasilków, przy północnej granicy Białegostoku. Odkrywkę glebową wykonano w odległości około 70 m od koryta rzeki. Badania prowadzono w lipcu 2012 i 2013 roku. Celem ich było określenie i porównanie struktur ilościowo-jakościowych zbiorowisk grzybów zasiedlających mursz i utwory mułowe odwodnionej gleby organicznej w kolejnych dwóch latach. Próby reprezentowały poziom darniowy, poddarniowy oraz warstwę utworu mułowego. Poza określeniem struktur ilościowo-jakościowych otrzymanych zbiorowisk grzybów, obliczono także podobieństwo między nimi. W sumie otrzymano 206 kolonii i 50 gatunków grzybów *micromycetes*. Zbiorowiska występujące w poszczególnych poziomach genetycznych, w kolejnych sezonach badawczych, różniły się strukturą ilościową i jakościową. Bardziej zróżnicowane były zbiorowiska zasiedlające glebę w 2013 roku. Podobieństwo między otrzymanymi zbiorowiskami układało się na niskim poziomie. Najwyższy wskaźnik podobieństwa – wynoszący zaledwie 18% – odnotowano między zbiorowiskami grzybów zasiedlającymi w kolejnych sezonach badawczych poziom poddarniowy. Natomiast cech wspólnych nie odnotowano między zbiorowiskiem zasiedlającym poziom darniowy w 2012 i warstwę mułu w 2013 roku. Uzyskane wyniki wskazują, że struktura jakościowa zbiorowisk grzybów *micromycetes* zasiedlających odwodnione, murszejące gleby organiczne limno-murszowe w dolinie Supraśli jest niestabilna. Sugeruje to, że nawet niewielkie zmiany siedliskowe, skutkują powstaniem zbiorowisk o odmiennej budowie gatunkowej. W istotny sposób wpływa to na niski poziom podobieństwa między zbiorowiskami grzybów zasiedlających analizowane gleby. Zauważono także związek między strukturami zbiorowisk grzybów a procesem murszenia, który przyczynia się do wzbogacenia i zróżnicowania struktur zbiorowisk grzybów.

**Słowa kluczowe:** grzyby glebowe, gleby organiczne murszowe

# 10 The changes occurring in the structures of *micromycetes* fungi communities inhabiting the muck soil in the Supraśl river valley

Zofia Tyszkiewicz

Technical University of Białystok, Department of Agri-Food  
Engineering and Environmental Management  
45A, Wiejska Street, 15-351 Białystok, Poland

e-mail: z.tyszkiewicz@pb.edu.pl

**Abstract:** The organic forms that make up soil belonging to the subtype of organic lime-muck soils were studied. The study site was located in the Supraśl river valley in ameliorated and unused in the time of study meadows, at about 70 m from the riverbed. The selected part of the valley was located in the area of Wasilków commune at the northern border of Białystok. The research was conducted in July 2012 and 2013. The aim was to identify and compare quantitative and qualitative structures of fungal colonization communities inhabiting the muck and silt deposits of dehydrated organic soil in the two subsequent years. The samples represented the turf, sub-roof level and the layer of silt. Besides determination of the quantitative and qualitative structures of the mushroom communities found, a similarity between them was also calculated. In total, 206 colonies and 50 species of micromycetes were identified. The fungal communities that occurred in particular genetic levels in subsequent research seasons differed in their quantitative and qualitative structures. The soil communities in 2013 were more diverse. The similarity between the identified communities was at a low level. The highest similarity index was obtained between the fungal communities that inhabited the sub-turf level in the two subsequent research seasons. It amounted only to 18%. On the other hand, there were no common features between the vegetation inhabiting the turf level in 2012 and that inhabiting the silt layer in 2013. The obtained results indicate that the qualitative structure of the micromycetes fungi communities inhabiting the dehydrated, organic lime-muck soils in the Supraśl valley is unstable. This suggests that even small habitat changes result in the creation of communities with different species structure. The consequence is a low level of similarity between the fungal communities inhabiting the analyzed soils. A connection was also noted between the structures of fungi communities and the mucking process. The muck contributes to the enrichment of both quantitative and qualitative structures of fungal communities.

**Key words:** soil fungi, organic-muck soils

## 1. Wstęp

Gleby należą do najważniejszych i najbardziej skomplikowanych środowisk, w których rozwijają się mikroorganizmy biorące udział w rozkładzie złożonych związków organicznych. Część produktów rozkładu jest wykorzystywana przez rośliny do produkcji biomasy, część jest wbudowywana w biomasę mikroorganizmów, część z kolei zostaje włączona w trudno rozkładalną pulę glebowej materii organicznej (Barabasz, Voříšek 2002; Bogacz i in. 2004; Niklińska, Stefanowicz 2015). Określono, że w 1 g gleby występuje od kilku tysięcy do kilku miliardów komórek bakterii. Podobna jest liczebność promieniowców. Natomiast biomasę grzybów najczęściej dwukrotnie przekracza biomasę bakterii. Wśród grzybów glebowych dominują organizmy saprotroficzne (Kwaśna 2014), prowadzące do mineralizacji podłoża, na którym rosną (Paul, Clark 2000). Pełnią one również wiele innych funkcji, między innymi wchodzi w interakcje z roślinami, istotnie wpływając na ich wzrost i rozwój, biorą też udział w tworzeniu struktury gleby oraz w przebiegu procesu humifikacji. Niewątpliwie są podstawowym ogniwem w glebowych łańcuchach troficznych, a stan zespołów grzybów *micromycetes*, tj. ich aktywność, liczba, czy też różnorodność, jest warunkiem koniecznym prawidłowego funkcjonowania ekosystemów lądowych (Niklińska, Stefanowicz 2015).

Gleby organiczne, ze względu na swoją genezę, składają się przede wszystkim z substancji organicznych, które stanowią dynamiczny układ ulegający ciągłym przemianom. Kierunek i dynamika tych przemian zależą od szaty roślinnej, działalności mikroorganizmów i zwierząt glebowych oraz fizykochemicznych właściwości gleby. Te z kolei są uzależnione od warunków wilgotnościowych i termicznych (Nadany, Sapek 2004; Kucharski i in. 2015). Obniżenie poziomu wody gruntowej i rolnicze użytkowanie gleb organicznych, powoduje niekorzystne zmiany w procesach zachodzących w tych glebach. Nadmierne odwodnienie, spowodowane melioracjami i suszą, wpływa na degradację, murszenie i zanik utworów organicznych (Ilnicki 2002; Nadany, Sapek 2004; Piaścik, Gotkiewicz 2004). Zjawiska te z kolei powodują przemiany zbiorowisk grzybów *micromycetes*, które bardzo szybko reagują na zmiany warunków środowiska. Powstające w ten sposób przeobrażenia zbiorowisk grzybów, są skutkiem oddziaływania zarówno czynników naturalnych, jak i antropogenicznych. Wynika to stąd, że na występowanie i charakter mikroorganizmów w glebie ma wpływ wiele czynników. Między innymi takich, jak: wilgotność, występujące rośliny oraz żyzność gleby (Traczewska 2011). Dlatego też zbiorowiska grzybów *micromycetes* mogą być wykorzystywane jako wskaźnik zmian środowiskowych przebiegających w glebach (Błaszczuk 2007; Mułenko 2008; Frączak 2010; Traczewska 2011; Niklińska, Stefanowicz 2015). Stąd też interesującym wyda-

je się poznanie zbiorowisk grzybów zasiedlających murszejące utwory mułowe. W związku z tym podjęto pracę, której celem było określenie i porównanie zbiorowisk grzybów *micromycetes* zasiedlających w kolejnych dwóch latach różne poziomy genetyczne murszejącej gleby organicznej, wytworzonej z utworów mułowych w dolinie Supraśli.

## 2. Teren i obiekt badań

Badania prowadzono lipcu 2012 i 2013 roku w dolinie rzeki Supraśl, która w ciągu ostatnich 30 lat została uregulowana i obwałowana. Obszar doliny został zmeliorowany, co przyczyniło się do mineralizacji utworów organicznych, w tym mułów. Tym samym doszło do wzrostu powierzchni gleb objętych murszeniem (Kiryłuk 2007, 2014; Roj-Rojewski i in. 2012). Ponadto teren wokół doliny podlega intensywnym procesom urbanizacyjnym, co nie pozostaje bez wpływu na procesy degradacji i zaniku gleb organicznych.

Badaniami objęto glebę należącą do rzędu gleb organicznych, typu gleb organicznych murszowych, podtypu gleb organicznych limno-murszowych (Systematyka gleb Polski 2011; Marcinek, Komisarz 2015). Punkt badawczy znajdował się na terenie gminy Wasilków, tuż przy północnej granicy Białegostoku. Położony był na aktualnie nieużytkowanych łąkach, w zmeliorowanej i odwodnionej części doliny Supraśli. Znajdował się w odległości 70 m od koryta rzeki, na tarasie zalewowym, na wysokości 115,5 m n.p.m.

W budowie profilowej analizowanej gleby odnotowano wyraźnie wykształcony poziom darniowy (M1). Miał on miąższość 16 cm, a stan jego uwilgotnienia określono jako świeży. Poziom ten był tworzony przez gruboziarnisty mursz o czarnej barwie, poprzerastany korzeniami roślin. Był on zamulony i mazisty. Niżej, do głębokości 36 cm, występował poziom poddarniowy (M2) – budowany przez ciemnobrunatny mursz o strukturze agregatowej, rozpadający się w dotyku na kawałki. Był on zamulony, mazisty i wilgotny. Pod warstwą murszu występował brunatnoczarny, plastyczny utwór mułowy (Lc), w którym do głębokości 70 cm odnotowano obecność torfu. Wśród dominującej amorficznej substancji organicznej znajdowały się fragmenty roślin torfotwórczych. Utwór ten pod naciskiem rozpadał się na kawałki, co świadczy o rozpoczęciu procesu mineralizacji (Roj-Rojewski i in. 2012). Muł na głębokości 70-81 cm był wyraźnie zapiaszczony i miał ciemnoszarą barwę. Głębiej, tj. poniżej 81 cm, znajdował się jasnożółty luźny piasek z cechami oglejenia. Muł i piasek były mokre.

Poziom wody gruntowej w 2012 roku występował na głębokości 52 cm, natomiast w 2013 roku – na głębokości 47 cm.

### 3. Metody

Próby do analiz mikologicznych pobrano z głębokości 10-15 cm (mursz tworzący poziom darniowy – M1), 20-30 cm (mursz tworzący poziom poddarniowy – M2) i 35-45 cm (warstwa mułu – Lc).

Do izolacji grzybów *micromycetes* wybrano metodę płytek glebowych Warcupa (Warcup 1950) w modyfikacji Mańki (Johnson, Mańka 1961; Mańka 1964; Mańka, Salmanowicz 1987). Natomiast podobieństwo między zbiorowiskami grzybów (wspólne cechy zbiorowisk wyrażone w %) określono przy pomocy współczynnika Jaccarda:

$$JI = \frac{j}{a + b - j}$$

gdzie:  $j$  – to liczba gatunków wspólnych dla obu zbiorowisk;  $a$  – oznacza liczbę gatunków występujących wyłącznie w jednym z analizowanych zbiorowisk,  $b$  – liczbę gatunków występujących wyłącznie w drugim z porównywanych zbiorowisk (Zak, Willig 2004).

### 4. Wyniki

Utwory organiczne analizowanej gleby były zasiedlone w sumie przez 206 kolonii i 50 gatunków grzybów.

Zbiorowiska grzybów *micromycetes* otrzymane ze wszystkich, analizowanych poziomów genetycznych w 2013 roku, były bogatsze – zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym – w porównaniu ze strukturami zbiorowisk zasiedlającymi analizowaną glebę w lipcu 2012 roku. Największą liczbę izolatów (86) i gatunków (31) uzyskano z poziomu darniowego w 2013 roku. Natomiast najmniej liczne było zbiorowisko grzybów zasiedlające warstwę mułu w 2012 roku. Otrzymano z niej 14 izolatów i 4 gatunki. W obu sezonach badawczych, najbogatsze struktury ilościowo-jakościowe odnotowano w poziomie darniowym. Zbiorowiska grzybów zasiedlające poziom poddarniowy i warstwę mułu posiadały mniejszą liczbę gatunków i izolatów, w porównaniu z poziomem przypowierzchniowym (darniowym; Tab. 1).

Pomimo porównywalnej liczby izolatów i gatunków tworzących otrzymane zbiorowiska poszczególnych poziomów genetycznych w obu sezonach badawczych (Tab. 1), skład gatunkowy zbiorowisk znacznie się różnił (Tab. 2). Nie odnotowano żadnego gatunku, który występowałby we wszystkich otrzymanych zbiorowiskach.



**Tabela 1.** Liczba gatunków i izolatów (frekwencja) grzybów w analizowanej glebie

**Table 1.** The number of fungi species and isolates (frequency) in the soil studied

Poziom genetyczny	2012		2013	
	Frekwencja	Liczba gatunków	Frekwencja	Liczba gatunków
poziom darniowy – M1	56	21	86	31
poziom poddarniowy – M2	15	5	19	8
warstwa mułu – Lc	14	4	16	4
Razem	85	25	121	36

M1 – poziom darniowy tworzony przez mursz

M2 – poziomu poddarniowy tworzony przez mursz

Lc – poziom limniczny tworzony przez muł (warstwa mułu)

Frekwencja poszczególnych gatunków nie była wysoka. Najwięcej izolatów, w liczbie 19 sztuk otrzymano w 2012 roku z poziomu darniowego gatunku, który nie zarodnikował. Stosunkowo wysoką frekwencją cechował się *Aspergillus niger* Tiegh. w poziomie darniowym w 2013 roku. Otrzymano wówczas 11 izolatów tego gatunku. Jednocześnie należy zauważyć, że *A. niger* wchodził w skład niemal wszystkich analizowanych zbiorowisk. Nie otrzymano go jedynie z poziomu darniowego w 2012 roku. Na uwagę zasługuje również rodzaj *Penicillium*. W trakcie przeprowadzonych badań otrzymano kilka gatunków należących do tego rodzaju; między innymi były to: *P. canescens* Sopp, *P. corylophilum* Dierckx, *P. daleae* K. W. Zaleski, *P. implicatum* Biourge, czy też *P. melinii* Thom (Tab. 2).

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w otrzymanych zbiorowiskach dominowały gatunki, których frekwencja wynosiła od 1 do 3 izolatów. To przede wszystkim one decydowały o zróżnicowaniu struktur ilościowo-jakościowych zespołów *micromycetes*. Jedynie nieliczna grupa gatunków była izolowana zarówno w 2012 i 2013 roku. Skutkowało to niskim poziomem podobieństwa między zbiorowiskami (Tab. 3).

**Tabela 2.** Gatunki grzybów najliczniej występujące w analizowanej glebie**Table 2.** Fungi species of the highest abundances in the soil studied

Poziom genetyczny	Gatunki grzybów	Frekwencja
2012 rok		
M1	Niezarodnikujący 1	19
	<i>Chaetomidium fimeti</i> (Fuckel) Zopf	4
	<i>Emericellopsis terricola</i> J.F.H. Beyma	3
	<i>Paecilomyces farinosus</i> (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm.	3
	<i>Penicillium daleae</i> K.W. Zaleski	3
	<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	3
M2	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	7
	<i>Helicosporum vegetum</i> Nees	5
Lc	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	9
	<i>Saprolegnia torulosa</i> de Bary	3
2013 rok		
M1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	11
	<i>Penicillium melinii</i> Thom	10
	<i>Exophiala jeanselmei</i> (Langeron) McGinnis & A.A. Padhye	8
	<i>Penicillium daleae</i> K.W. Zaleski	7
	<i>Chaetomium</i> sp.	5
	<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	4
	<i>Humicola grisea</i> Traaen	3
	<i>Penicillium canescens</i> Sopp	3
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	3	
M2	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	6
	<i>Acremonium kiliense</i> Grütz	3
	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	3
Lc	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	7
	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	6

Oznaczenia jak w tabeli 1

**Tabela 3.** Podobieństwo wyrażone w procentach między zbiorowiskami grzybów zasiedlającymi analizowaną glebę

**Table 3.** Similarity percentages between communities of soil fungi in the soil studied

Poziom genetyczny	Rok badań	2013		
		M1	M2	Lc
2012	M1	13	11	0
	M2	3	18	12
	Lc	3	9	14

Oznaczenia jak w tabeli 1

Najwyższe podobieństwo, jednak zaledwie na poziomie 18%, odnotowano między zbiorowiskami grzybów zasiedlającymi poziom poddarniowy (M2) w 20102 i 2013 roku. Podobieństwem wynoszącym 14% cechowały się zbiorowiska grzybów otrzymane z warstwy mułu w obu sezonach badawczych. Natomiast między zbiorowiskami zasiedlającymi poziom darniowy, podobieństwo kształtowało się na poziomie 13%. Cech wspólnych (podobieństwo 0%) nie odnotowano między zbiorowiskami grzybów zasiedlającymi poziom darniowy w 2012 roku i warstwę mułu w 2013 roku (Tab. 3).

## 5. Dyskusja

Prowadzone badania wskazują, że utwory organiczne murszejącej gleby organicznej limno-murszowej z doliny Supraśli cechowały się zróżnicowanymi strukturami zbiorowisk grzybów *micromycetes*. Struktury te ulegały zubożeniu, wraz z głębokością w profilu glebowym. Było to niewątpliwie efektem wzrostu uwilgotnienia substratu organicznego i zmniejszania się ilości powietrza (Piaścik, Gotkiewicz 2004). Jednocześnie w obu sezonach badawczych, najliczniejszymi zbiorowiskami oraz o najbogatszym składzie gatunkowym, cechował się przypowierzchniowy poziom gleby. Przyczynę tego stanu rzeczy należy wiązać z odwodnieniem gleby, spowodowanym przede wszystkim czynnikiem antropogenicznym – melioracjami doliny, użytkowaniem łąk, urbanizacją sąsiedztwa doliny. Po odwodnieniu gleby organicznej, dochodzi w niej do zmurszenia masy organicznej i zwiększonej aktywności biologicznej – na skutek lepszego natlenienia (Bogacz i in. 2004; Turbiak, Miatkowski 2006, 2010; Systematyka gleb Polski 2011). Stąd też poziom darniowy analizowanej gleby cechował się liczniejszym składem ilościowym i jakościowym zbiorowisk grzybów – w porównaniu z niżej leżącymi poziomami gene-

tycznymi, przede wszystkim z warstwą mułu. Na odmienne właściwości poziomu przypowierzchniowego i niżej leżącej warstwy mułu wskazuje również brak cech wspólnych (podobieństwo na poziomie 0%) między otrzymanymi zbiorowiskami *micromycetes*.

Wśród otrzymanych gatunków grzybów, dominowały organizmy saprotroficzne, które zajmują się dekompozycją związków organicznych. Podstawowym ich zadaniem jest rozkład substancji organicznej i włączanie pierwiastków do obiegu w środowisku przyrodniczym (Paul, Clark 2000; Kwaśna 2014; Niklińska, Stefanowicz 2015). Grzyby *micromycetes* rozkładają resztki roślinne i część masy organicznej, przetwarzając je w humus. Tym samym wpływają na przebieg procesu murszenia, przyspieszając go (Barabasz, Voříšek 2002; Bogacz i in. 2004). Jak z tego wynika, proces murszenia wiąże się ze wzmożonym rozwojem mikroorganizmów glebowych. Tym samym grzyby *micromycetes* stanowią ważny składnik ekologiczny, określający typ biologicznego rozkładu substancji organicznej oraz produkcji biomasy. Jednocześnie struktury zespołów grzybów zależą od całości warunków ekologicznych danego środowiska i są składnikiem biocenozy najszybciej reagującym na zmiany jego parametrów (Błaszczuk 2007; Mułenko 2008; Frączak 2010; Traczewska 2011). Istotną rolę w procesach zachodzących w analizowanej glebie miał *Aspergillus niger* oraz grzyby należące do rodzaju *Penicillium*.

Uzyskane wyniki wskazują, że odwodnienie gleby organicznej limno-murszowej i towarzysząca temu mineralizacja utworów organicznych, wpłynęła na zmiany struktury zasiedlających je zespołów grzybów. Jednocześnie wyraźne zróżnicowanie zbiorowisk grzybów w kolejnych sezonach badawczych (2012 i 2013 roku) oraz niewielkie podobieństwo między zbiorowiskami otrzymanymi z tych samych poziomów genetycznych wskazują, że zbiorowiska te są bardzo niestabilne. Ich struktury ilościowe, a przede wszystkim jakościowe, ulegają dynamicznym zmianom. Przeprowadzone badania nie pozwalają na wykazanie prawidłowości w kształtowaniu się składu gatunkowego zbiorowisk grzybów odwadnianej gleby organicznej.

## 6. Wnioski

Na podstawie badań można sformułować następujące wnioski:

1. Zbiorowiska grzybów analizowanej gleby limno-murszowej z przekształconej antropogenicznie doliny Supraśli w dwóch sezonach badawczych cechowały się wyraźnym zróżnicowaniem struktur ilościowych i jakościowych. Zbiorowiska otrzymane w 2013 roku posiadały większą liczbę izolatów i gatunków – w porównaniu ze zbiorowiskami z 2012 roku.

- 2 Zbiorowiska grzybów zasiedlające mursz poziomu darniowego, odznaczały się bogatszym składem ilościowym i gatunkowym – w porównaniu z niżej leżącym murszem poziomym poddarniowym oraz warstwą mułu. Tym samym wskazuje to, że proces murszenia gleb organicznych, wytworzonych z utworów mułowych, przyczynia się do wzbogacenia struktur zbiorowisk zasiedlających je grzybów.
3. Jednak, mimo podobnych tendencji, otrzymane zbiorowiska grzybów w dwóch sezonach badawczych, charakteryzowały się wyraźnymi różnicami. Charakter struktur gatunkowych i ilościowych zbiorowisk grzybów analizowanej gleby był dynamiczny i mało stabilny. Stąd też, na podstawie prezentowanych badań, nie można przypisać im znaczenia bioindykacyjnego.
4. Występowanie i liczebność *Aspergillus niger* oraz grzybów należących do rodzaju *Penicillium* wskazuje, że miały one istotną rolę w procesach zachodzących w analizowanej murszejącej glebie wytworzonej z utworów mułowych.

## Literatura

- Barabasz W., Voříšek K. 2002. Bioróżnorodność mikroorganizmów w środowisku glebowym. [W:] Barabasz W. (red.), Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach. Wyd. Katedra Mikrobiologii AR, Kraków: 23–34.
- Błaszczyk M. K. 2007. Mikroorganizmy w ochronie środowiska. PWN, Warszawa.
- Bogacz A., Szulc A., Bober A., Płaskowska E., Matkowski K. 2004. Wpływ stopnia zmurszenia torfu na skład i liczebność grzybów glebowych obiektu Przedmoście. Roczn. Glebozn., 55(3): 39–51.
- Frączek K. 2010. Skład mikrobiocenotyczny drobnoustrojów biorących udział w procesach przemian azotu w glebie w otoczeniu składowiska odpadów komunalnych. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie 10, 2(30): 61–71.
- Ilnicki P. 2002. Torfowiska i torf. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań.
- Johnson L. F., Mańka K. 1961. A modification of Warcup's soil-plate method for isolating soil fungi. Soil Sci., 92: 79–84.
- Kiryłuk A. 2007. Zmiany siedlisk pobagiennych i fitocenoz w dolinie Supraśli. Rozp. Nauk. i Monografie 20. Wyd. IMUZ, Falenty.
- Kiryłuk A. 2014. Wpływ odwodnienia na fizyko-wodne właściwości gleb pobagiennych na obiekcie łąkarskim w dolinie rzeki Supraśl. Inż. Ekol., 38: 26–34.
- Kucharski J., Barabasz W., Bielińska E. J., Wyszowska J. 2015. Właściwości biologiczne i biochemiczne gleby. [W:] Mocek A. (red.), Gleboznawstwo. PWN, Warszawa: 232–280.
- Kwaśna H. 2014. Mikrobiologia rolnicza. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań.

- Mańka K. 1964. Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. *Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn., PTPN*, 17: 29–45.
- Mańka K., Salmanowicz B. 1987. Udoskonalenie niektórych technik zmodyfikowanej metody płytek glebowych do izolowania grzybów z gleby z punktu widzenia mikologii fitopatologicznej. *Rocz. Nauk Roln., E(17)*: 35–46.
- Marcinek J., Komisarek J. 2015. *Systematyka gleb Polski*. [W:] Mocek A. (red.). *Gleboznawstwo*. PWN, Warszawa: 281–364.
- Muńenko W. 2008. *Mykologiczne badania terenowe. Przewodnik metodyczny*. Wyd. UMCS, Lublin.
- Nadany P., Sapek A. 2004. Zróżnicowanie stężenia węgla organicznego w wodzie gruntowej w różnie użytkowanych glebach torfowych. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 4/2b (12): 281–289.
- Niklińska M., Stefanowicz A. M. 2015. Bakterie, glony, grzyby, porosty terenów metalonoznych. [W:] Wierzbińska M. (red.), *Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale*. Wyd. Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa: 207–225.
- Paul E. A., Clark F. E. 2000. *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Wyd. UMCS, Lublin.
- Piaścik H., Gotkiewicz J. 2004. Przeobrażenia odwodnionych gleb torfowych jako przyczyna ich degradacji. *Rocz. Glebozn.*, 55(2): 331–338.
- Roj-Rojewski S., Korol A., Zienkiewicz A. 2012. Wpływ warunków wodnych na właściwości fizyczne i pokrywą roślinną gleb murszowych położonych na odwodnionych siedliskach mułowych. *Inż. Ekol.*, 29: 141–152.
- Systematyka gleb Polski*. 2011. *Rocz. Glebozn.* 62(3/4). Wyd. Wieś Jutra, Warszawa.
- Traczewska T. M. 2011. *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*. Oficyna Wydaw. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Turbiak J., Miatkowski Z. 2006. Wpływ odwodnienia na mineralizację organicznych związków azotu i zawartość mineralnych form azotu w glebie torfowo-murszowej. [W:] Brandyk T., Szajdak L., Szatyłowicz J., (red.), *Właściwości fizyczne i chemiczne gleb organicznych*. SGGW. Warszawa: 205–214.
- Turbiak J., Miatkowski Z. 2010. Emisja CO<sub>2</sub> z gleb pobagiennych w zależności od warunków wodnych siedlisk. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 19(29): 201–210.
- Warcup J. H. 1950. The soil plate method for isolation of fungi from soil. *Nature*, 166: 117–118.
- Zak J. C., Willig M. R. 2004. Fungal biodiversity patterns. [W:] Mueller G. M., Bills G. F., Foster M. S. (red.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo: 59–75.



# Flora naczyniowa opuszczonych osad leśnych Pojezierza Myśliborskiego

Aleksander **Smoliga**<sup>1</sup> / Konrad **Świtalski**<sup>2</sup>

1 Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych w Szczecinie  
ul. J. Słowackiego 2, 71-434 Szczecin

e-mail: aleksander.smoliga@szczecin.lasy.gov.pl

2 Nadleśnictwo Piaski  
ul. Drzędzewska 1, 63-820 Piaski

e-mail: nashorn@autograf.pl

**Streszczenie:** W pracy dokonano charakterystyki flory naczyniowej opuszczonych sadyb leśnych Pojezierza Myśliborskiego. Region objęty badaniami jest miejscem styku wielu kultur i narodowości. Ślady dawnych osad są zauważalne w kompleksach leśnych. Człowiek na przestrzeni lat wprowadzał w swoim otoczeniu różnorodne gatunki drzew, krzewów i roślin zielnych, które miały za zadanie zdobić jego otoczenie, stanowić źródło pożywienia oraz chronić przed wiatrem. Prace terenowe prowadzono na obszarach leśnych, położonych w granicach Pojezierza Myśliborskiego. Różnicowane warunki glebowe i klimatyczne powodują, że występują tutaj zbiorowiska roślinne o znacząco odmiennych wymaganiach ekologicznych. Badania prowadzono w latach 2013–2018 w miejscach, które zostały opuszczone przez człowieka w okresie od 1900 r. do 2010 r. Podczas prac terenowych wykonywano spisy florystyczne na powierzchniach podstawowych i porównawczych. Łącznie wykonano 180 spisów. Stwierdzono występowanie 350 gatunków roślin naczyniowych. W granicach opuszczonych osad leśnych występowało 345 taksonów, natomiast na powierzchniach referencyjnych napotkano 300 gatunków. Flora dawnych osad położonych w kompleksach lasów łąkowych i bukowych z czasem staje się podobna do przyległych fitocenoz. Dawne osady leśne stanowią miejsca, często charakteryzujące się dużą różnorodnością gatunkową – w porównaniu z florą powierzchni referencyjnych. W granicach dawnych nieruchomości na terenach leśnych tworzą się niewielkie strefy ekotonowe, złożone głównie z gatunków charakterystycznych dla zbiorowisk: leśnych, łąkowych i ruderalnych. Opuszczone osady leśne stanowią refugium wielu rodzimych gatunków drzew, krzewów oraz roślin zielnych. Niektóre gatunki szybko tworzą wtórne populacje na terenach leśnych, natomiast inne taksony znacznie wolniej poszerzają swój areał występowania.

**Słowa kluczowe:** gatunki obce, antropopresja, północno-zachodnia Polska



# 11 Vascular flora of abandoned forest settlement in the Myśluborskie Lakeland region (NW Poland)

Aleksander Smoliga<sup>1</sup> / Konrad Świtalski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Regional Directorate of State Forests in Szczecin

2, J. Słowackiego Street, 71-434 Szczecin, Poland

e-mail: aleksander.smoliga@szczecin.lasy.gov.pl

<sup>2</sup> Piaski Forest District

1, Drzędzewska Street, 63-820 Piaski, Poland

e-mail: nashorn@autograf.pl

**Abstract:** This paper characterizes the vascular flora of the abandoned forest settlement. The region covered by the research is a place where many cultures and nationalities meet. Traces of ancient settlements are noticeable in dense forest complexes. The man introduced in their surroundings various species of trees, bushes and herbaceous plants that were supposed to be used to decorate its surroundings, provide a source of food and protect against the wind. Field works were carried out in forest areas located within the boundaries of the Myśluborskie Lakeland Region. Diverse soil and climatic conditions make them appear here plant communities with very different ecological requirements. Research carried out in 2013-2018 in places that were abandoned by man in from 1900 to 2010. During fieldwork, floristic lists were made on basic and comparative surfaces. In total, 180 inventories were made. During field work, on primary and reference surfaces, 350 species of vascular plants were found. In abandoned areas there were 345 taxa in the forest sediment and reference areas in the forest 300 species were encountered. Flora of former settlements located in forest-edge forests and beech with time becomes similar to adjacent phytocoenoses. Former forest settlements are places often characterized by large diversity species compared to the reference areas. Within old limits real estate in forest areas is formed by small ecotone zones composed mainly from species characteristic for forest, meadow and ruderal communities. Abandoned forest settlements are a refugium of many native species of trees, shrubs and herbaceous plants. Some species quickly form secondary populations in forest areas, while other taxa significantly widen their range of occurrence.

**Keywords:** alien species, anthropopressure, NW Poland

## 1. Wstęp

Pojezierze Myśluborskie, będące częścią Pomorza Zachodniego, ma swoją odrębność historyczną, kulturową i geograficzną. Historia tego terenu jest bardzo bogata, jako że region był miejscem styku wielu kultur i narodowości. Mieszanie się różnorodnych wpływów znalazło swoje odzwierciedlenie w kształtowaniu się sieci osadniczej. Duża lesistość Pojezierza Myśluborskiego miała również wpływ na osadnictwo leśne (Jankowiak 2002).

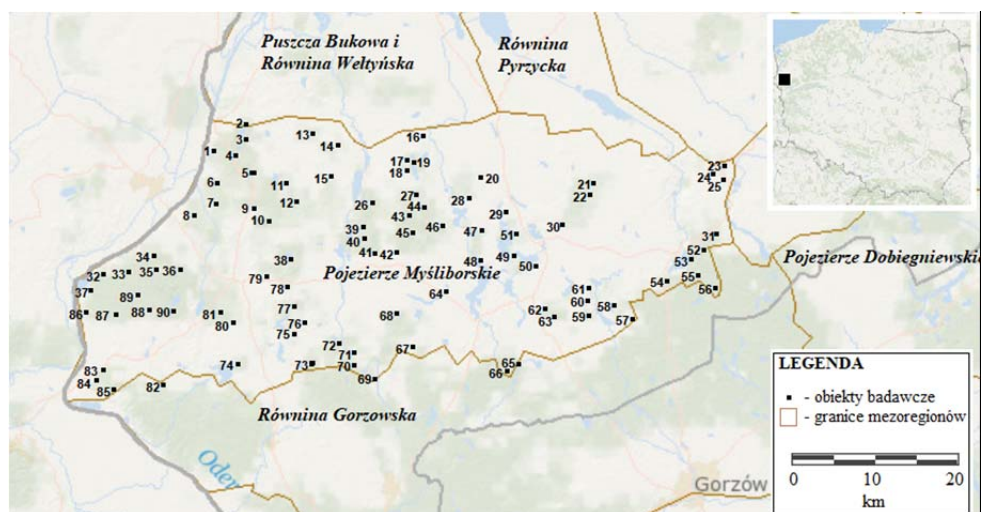
Prowadzenie gospodarki leśnej jest związane z koniecznością tworzenia infrastruktury, szczególnie dróg, składnic drewna, domów i budynków gospodarczych służących pracownikom. Rozmieszczenie osad na terenach leśnych miało usprawnić wykonywanie i nadzorowanie prac leśnych. Niektóre osady położone w lasach były zamieszkiwane również przez osoby niezwiązane z administracją leśną. W wyniku działań wojennych, przemian ustrojowych oraz z powodu innych przyczyn, ludzie opuszczali leśne sadyby, które zazwyczaj popadały w ruinę lub teren po nich przekształcano w uprawę leśną. Zależnie od zarządcy lub właściciela lasu, rozmaicie kształtowała się sieć osadnictwa leśnego, wielkość sadyb leśnych oraz ich architektura. W kompleksach leśnych budowano również: młyny, tartaki, owczarnie, stajnie, żwirownie czy gorzelnie (Hutnikiewicz 1999). Po 1945 roku na terenie Polski siedziby leśnictw były budowane głównie w miejscowościach lub na skraju kompleksów leśnych, natomiast budynki dla pracowników leśnych były często budowane w głębi lasu (Klimek 1995).

Ślady dawnych osad są łatwo zauważalne w zwartych kompleksach leśnych. Człowiek wprowadził w swoim otoczeniu różnorodne gatunki drzew, krzewów i roślin zielonych, które miały za zadanie zdobić jego otoczenie, stanowić źródło pożywienia oraz chronić przed wiatrem. Z czasem rośliny uprawiane przez człowieka znajdowały nowe środowisko życia w sąsiadujących lasach oraz na łąkach i nieużytkach. Wielu gatunkom nie udało się zadomowić w zbiorowiskach leśnych, natomiast niektóre stanowią zagrożenie dla składu i struktury zbiorowisk leśnych (Tokarska-Guzik i in. 2012). W opuszczonych miejscach bytowania człowieka występują zarówno gatunki wprowadzone przez niego oraz wnikają taksony leśne. Skład gatunkowy zbiorowisk w miejscach niegdyś zajętych przez człowieka zależy głównie od czasu, jaki upłynął od momentu opuszczenia osady przez człowieka (Danielewicz, Wiatrowska 2014) oraz gatunków występujących w pobliskim lesie.

W granicach Pojezierza Myśluborskiego były dotychczas prowadzone prace florystyczne, zarówno przez botaników niemieckich i polskich (Libbert 1941; Bacieczko i Kochanek 2009). Flora opuszczonych leśniczówek oraz osad leśnych opisywanego terenu nie była dotychczas przedmiotem badań.

## 2. Teren badań

Prace terenowe prowadzono na obszarach leśnych położonych w granicach Pojezierza Myśliborskiego (Ryc. 1), na gruntach znajdujących się w zarządzie nadleśnictw: Barlinek, Chojna, Choszczno, Mieszkowice, Myślibórz i Różańsko. Zgodnie z regionalizacją Kondrackiego (2009), teren badań obejmuje Pojezierze Myśliborskie, w którego granicach występują licznie formy glacialne, związane z wysuniętym najdalej na południe zasięgiem fazy pomorskiej, zlodowacenia wiślańskiego. Wzgórza morenowe sporadycznie przekraczają wysokość 100 m n.p.m., wysokości względne wynoszą od 20 m do 40 m. W zachodniej części regionu występują największe kompleksy leśne.



**Rycina 1.** Teren badań z zaznaczonym położeniem obiektów badawczych (opracowanie własne na podstawie geoportal.gov.pl). Położenie badanych obiektów, współrzędne w układzie WGS 84, nazwy lokalne polskie lub niemieckie.

**Figure 1.** Research area with marked location of research objects (own elaboration based on geoportal.gov.pl). Location of the studied objects, coordinates in the WGS 84 system, local Polish or German names.

(1) 14.3864, 53.1108 – *Grodzisko*; (2) 14.4346, 53.1172 – *Schäffer-Fenn*; (3) 14.4257, 53.1071 – *Marzkowo*; (4) 14.4190, 53.1083 – *Fidichow*; (5) 14.4117, 53.0848; (6) 14.3692, 53.0813 – *Rybakówka*; (7) 14.3632, 53.0440; (8) 14.3898, 53.0498; (9) 14.4385, 53.0166 – *Polesiny*; (10) 14.4710, 53.0387; (11) 14.4997, 53.0583 – *Kolbitz*; (12) 14.5014, 53.0359 – *Pankow Hof*; (13) 14.5151, 53.0795 – *Forst Kehrberg*; (14) 14.5428, 53.0637 – *Forst Marienthal* (15) 14.5702, 53.0640 *Pinesee, Pącznik*; (16) 14.7399, 53.0943 – *Duttenhof*; (17) 14.7280, 53.0669 – *Forst-Amt Neuendorf*; (18) 14.7481, 53.0671 – *Unter Grosse Petzник – See*; (19) 14.7440, 53.0697 – *Vm.*

*Duttenhof, Topielec*; (20) 14.8859, 53.1038 – *Naulin, Nowieliński Ług*; (21) 15.0287, 53.0428 – *Steinwehrruh, Żelice*; (22) 15.0163, 53.0200 – *Lipphener Tanger, Dzedzinka*; (23) 15.2676, 53.0737 – *Forst-Amt Jagow, Jagów*; (24) 15.2353, 53.0713 – *Arnimsthal, Stajnia*; (25) 15.2922, 53.0575 *Trepehner See, Trzebień*; (26) 14.6100, 53.0130 – *Schmidt-Wiese, Jezioro Grodziskie*; (27) 14.7205, 53.0375 – *Marienfelde, Maruszewo*; (28) 14.7962, 53.0476 – *Siedlung in Pyritzer Stadt Forst, Świdzianko*; (29) 14.8824, 53.0153 – *Mironow, Grochacz*; (30) 14.9893, 53.0092 – *Mielzin, Kołatka*; (31) 15.2485, 53.0058 – *Paulinenhof*; (32) 14.1796, 52.9656 – *Forst Terrofen, Stara Żwirownia*; (33) 14.2136, 52.9452 – *Forst Dreipfuhl, Trzypole*; (34) 14.2164, 52.9343; (35) 14.2768, 52.9287 – *Forst Kleine Petzig, Stara Leśniczówka*; (36) 14.3413, 52.9555 – *Huba*; (37) 14.1569, 52.9294 – *Markenthim, Markocin*; (38) 14.5127, 52.9768 – *Forst Steinwehr, Jezioro Leśne*; (39) 14.6373, 53.0181; (40) 14.6272, 53.0144; (41) 14.6287, 52.9831; (42) 14.6708, 52.9843; (43) 14.7003, 53.0196 – *Linde*; (44) 14.7905, 53.0497 – *Las Przydarłowski*; (45) 14.7891, 53.0126; (46) 14.8339, 53.0561 – *Eichberg*; (47) 14.8523, 53.0041 – *Mittelbruch*, (48) 14.8484, 52.9786 – *Karlshof*; (49) 14.9463, 52.9716; (50) 14.9842, 52.9664; (51) 14.9174, 52.9972 – *Wilhelmshöhe*; (52) 15.1402, 52.9590; (53) 15.1828, 52.9550 – *Sumpf, Bagno*; (54) 15.1535, 52.9467; (55) 15.1589, 52.9333; (56) 15.1271, 52.9333; (57) 15.1246, 52.9101 – *Lindwerder*; (58) 15.0779, 52.9187 – *Mienwald*; (59) 15.0292, 52.9086 – *Forst Adamsdorf*; (60) 15.0256, 52.9149 – *Waldbruch, Łowisko*; (61) 15.0476, 52.9459 – *Kornatka*; (62) 14.9680, 52.9034 – *Forst Adamsdorfer, Stara Leśniczówka*; (63) 14.9445, 52.9140; (64) 14.7531, 52.9489; (65) 14.9015, 52.8496 – *Einmanhof, Zacisze*; (66) 14.8938, 52.8554 – *Soldiner Stadt-Forst*; (67) 14.7135, 52.8855 – *Winkel, Żwirownia*; (68) 14.6842, 52.8994 – *Zernickower Wald*; (69) 14.5980, 52.8416 – *Ferdinandsfelde*; (70) 14.5650, 52.8628; (71) 14.5478, 52.8635; (72) 14.5301, 52.8868 – *Jezioro Gorzelniane*; (73) 14.5012, 52.8435; (74) 14.4130, 52.8584 – *Krump holzmühle, ruiny młyna*; (75) 14.5138, 52.8921 – *Brwice*; (76) 14.5264, 52.9191 – *Karpaten, Owczarnia*; (77) 14.5090, 52.9262 – *Wedell*; (78) 14.5028, 52.9411; (79) 14.4642, 52.9583 – *Veilcenthal*; (80) 14.3978, 52.9020 – *Forst Tanger*; (81) 14.3888, 52.9101 – *Forst Tanger*; (82) 14.2635, 52.8352; (83) 14.1650, 52.8271; (84) 14.1422, 52.8225 – *Ameryka*; (85) 14.2635, 52.8352 – *Schweinepfeife*; (86) 14.1503, 52.9164; (87) 14.1975, 52.9009 – *Schneidemühle*; (88) 14.1975, 52.9009 – *F. Louisenhort*; (89) 14.2705, 52.9364 – *F. Dreipfuhl*; (90) 14.2968, 52.9279 – *Wustrow, Olszyny Ostrowskie*.

Opierając się na regionalizacji geobotanicznej J. M. Matuszkiewicza (1993, 2008), szata roślinna obszaru badań, jako część krajobrazów roślinnych Polski, zaliczana jest do działu Pomorskiego. Dział Pomorski cechuje znaczący udział zbiorowisk o subatlantyckim typie zasięgu. Klimat badanego obszaru ma typowe cechy klimatu morskiego, średnia roczna suma opadów kształtuje się na poziomie 650-800 mm, dominują wiatry z kierunku zachodniego (Borówka 2005; Koźmiński 2001). Współczesny krajobraz Pojezierza Myśliborskiego został ukształtowany w czwartorzędzie, przez wkraczające tu czterokrotnie lodowce. Gleby omawianego obszaru są młode, zaczęły się one tworzyć dopiero w okresie postglacjalnym; dominują gleby brunatne, płowe i bielcowe (Kondracki 2000, 2009; Borówka 2005).

Teren badań położony jest w dorzeczu Odry. Ważniejsze rzeki na tym obszarze to: Odra, Myśla oraz Kurzyca (Atlas podziału hydrograficznego Polski 2005). Główny zrąb roślinności stanowi element środkowoeuropejski (Żukowski i Jackowiak 1995; Jasnowska 2002; Myśliwy 2003).

Obszar północno-zachodniej Polski był niegdyś niemalże w całości pokryty przez lasy. Obecnie duże przestrzenie zajęły pola uprawne i tereny zurbanizowane. Zróżnicowane warunki glebowe, wynikające z urozmaiconej rzeźby terenu i budowy geologicznej powodują, że występują tutaj zbiorowiska roślinne o znacząco odmiennych wymaganiach ekologicznych. Wielkie obszary, zajęte niegdyś przez grądy i buczyny, zostały w większości przekształcone w pola uprawne, a monokultury, zdominowane przez sosnę i świerk, zajęły miejsce lasów zbliżonych do naturalnych (Jasnowska 2002; Bacieczko i Kochanek 2009).

### 3. Metody badań

Prace badawcze prowadzono w latach 2013–2018 na terenie opuszczonych osad leśnych położonych w granicach Pojezierza Myśliborskiego. Powierzchnia badanych obiektów wynosiła od 0,05 do 0,50 ha, została ona zmierzona w terenie – w przypadku sadyb niebędących osobnym wydzieleniem, lub ustalona w oparciu o dane z powszechnie dostępnych systemów informacji przestrzennej oraz Systemu Informatycznego Lasów Państwowych. Każdorazowo podczas prac terenowych określono granice nieruchomości, w obrębie których prowadzono badania. Prace badawcze prowadzono w miejscach, które zostały opuszczone przez człowieka w okresie od 1900 r. do 2010 r. Informacje na temat niezamieszkanich osad ludzkich pochodziły z map przeglądowych, publikacji dotyczących Pojezierza Myśliborskiego, danych udostępnionych przez nadleśnictwa oraz przeprowadzonych w latach 2013 i 2016 rekonesansów terenowych. W pracy wykorzystano również mapy archiwalne z zasobów Archiwum Map Pomorza Zachodniego. Cennym źródłem wiedzy o sieci osadniczej były także informacje otrzymane od mieszkańców okolicznych miejscowości, dawnych oraz obecnych pracowników Lasów Państwowych.

Podczas prac terenowych wykonywano spisy florystyczne na powierzchniach podstawowych, które zakładano w miejscach po opuszczonych osadach leśnych. Uzupełnieniem badań wykonanych na powierzchniach podstawowych były prace prowadzone na powierzchniach porównawczych (referencyjnych). Łącznie powstało 180 spisów florystycznych w granicach dawnych osad leśnych oraz na powierzchniach referencyjnych. Powierzchnie porównawcze zakładano w bezpośrednim

sąsiedztwie osad leśnych, w lasach gospodarczych. Celem zakładania powierzchni referencyjnych było przede wszystkim zbadanie kierunków migracji roślin pomiędzy lasem a opuszczoną osadą leśną. Położenie miejsc, w których wykonywano spisy florystyczne, ustalono przy użyciu odbiornika GPS (TRIMBLE 3G), granice powierzchni porównawczych oznaczono z wykorzystaniem dalmierza laserowego. Badania obejmowały inwentaryzację flory naczyniowej. Spisy florystyczne przechowywano w programie Turboveg 2.0. (Hennekens, Schaminée 2001). Zinwentaryzowane gatunki roślin były oznaczane w terenie, natomiast niektóre taksony identyfikowano w trakcie prac kameralnych z wykorzystaniem kluczy do oznaczania flory naczyniowej. Nomenklaturę gatunków przyjęto według Mirka i in. (2002).

#### 4. Wyniki badań

Opuszczone leśniczówki oraz sadyby leśne wyróżniają się dużym bogactwem florystycznym. Podczas prac terenowych, na powierzchniach podstawowych i referencyjnych, stwierdzono występowanie 350 gatunków roślin naczyniowych. W granicach opuszczonych osad leśnych występowało 345 taksonów, natomiast na powierzchniach referencyjnych napotkano 300 gatunków (Tab. 1). W wielu sytuacjach widoczne jest przenikanie gatunków typowo leśnych, między innymi: *Anemone nemorosa* L., *A. ranunculoides* L., *Carex digitata* L., *C. remota* L., *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H. P. Fuchs, *Galium odoratum* (L.) Scop., *G. sylvaticum* L., *Mercurialis perennis* L., *Stachys sylvatica* L., *Viola riviniana* Rchb., do zbiorowisk powstałych w miejscach niegdyś zamieszkałych przez człowieka. W granicach opuszczonych posesji zanotowano występowanie wielu gatunków drzew i krzewów, w tym taksonów obcych i inwazyjnych, między innymi: *Acer negundo* L., *Impatiens parviflora* DC., *Prunus serotina* Ehrh., *Reynoutria japonica* Houtt., *Solidago canadensis* L. Pośród drzew i krzewów duży udział mają gatunki owocowe i ich odmiany, między innymi: *Malus domestica* Borkh., *Prunus domestica* L. subsp. *domestica*, *Pyrus communis* L. i *Rubus idaeus* L.

Fizjonomia wielu opuszczonych miejsc jest podobna. Przy granicy dawnych nieruchomości wprowadzano drzewa i krzewy, należące do rodzajów *Carpinus* L., *Fagus* L., *Ligustrum* L., które były często formowane w żywopłoty. W kilku miejscach napotkano fragmenty żywopłotu z grabu lub buka, w niektórych osadach przy granicach sadzono drzewa z rodzaju *Picea* Mill., *Larix* Mill. i *Thuja* L. Przy niektórych leśnych osadach, opisanych na mapie jako: *Einmannhof*, *Forst Kleine Petzig*, *Krump holzmühle*, *Lippheuer Tanger*, można spotkać wysokie drzewa, które

zajmowały miejsce przy dawnej bramie wjazdowej lub wejściu na posesję; czasami były to świerki, żywotniki, daglezie lub modrzewie. Modrzew wprowadzano również w celu ochrony przed wiatrami, na granicy z otwartą powierzchnią lub pomiędzy drogą leśną a posesją. W wielu opuszczonych osadach można zauważyć, że granice nieruchomości rzadko przylegały bezpośrednio do drzewostanu. Zaobserwowano, że w opuszczonych leśniczówkach: *Forst Kehrberg*, *Forst-Amt Neuendorf*, *Forst Adamsdorfer* wprowadzano roślinność poza granicami zabudowań.

**Tabela 1.** Flora badanych obiektów i częstość jej występowania

**Table 1.** Flora of the examined objects and the frequency of its occurrence

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Acer campestre</i> L.	4	6
<i>Acer ginnala</i> Maxim.	2	1
<i>Acer negundo</i> L.	68	66
<i>Acer platanoides</i> L.	65	12
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	55	10
<i>Achillea millefolium</i> L.	54	3
<i>Aegopodium podagraria</i> L.	52	14
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	12	2
<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	8	2
<i>Agrostemma githago</i> L.	3	1
<i>Ajuga genevensis</i> L.	4	8
<i>Ajuga reptans</i> L.	6	10
<i>Alchemilla monticola</i> Opiz	8	1
<i>Alliaria petiolata</i> (M. Bieb.) Cavara & Grande	56	34
<i>Allium oleraceum</i> L.	9	10
<i>Allium ursinum</i> L.	1	4
<i>Allium vineale</i> L.	13	6
<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	12	22
<i>Alnus incana</i> (L.) Moench	4	6
<i>Alopecurus pratensis</i> L.	8	2
<i>Anchusa officinalis</i> L.	6	2
<i>Anemone nemorosa</i> L.	12	34
<i>Anemone ranunculoides</i> L.	8	29
<i>Anthemis tinctoria</i> L.	6	1
<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm.	40	32
<i>Arctium lappa</i> L.	52	38

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh.	28	12
<i>Arctium tomentosum</i> Mill.	22	18
<i>Armoracia rusticana</i> G. Gaertn. et al.	25	3
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. Beauv. ex J. Presl & C. Presl	44	7
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	43	8
<i>Asarum europaeum</i> L.	8	6
<i>Asparagus officinalis</i> L.	19	2
<i>Aster amellus</i> L.	6	1
<i>Aster novae-angliae</i> L.	6	-
<i>Aster novi-belgii</i> L.	3	3
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	12	8
<i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth	6	18
<i>Athyrium nipponicum</i> (Mett.) Hance	5	1
<i>Atriplex patula</i> L.	6	1
<i>Avena fatua</i> L.	16	2
<i>Barbarea vulgaris</i> W. T. Aiton	18	5
<i>Bellis perennis</i> L.	22	1
<i>Berberis thunbergii</i> DC.	8	6
<i>Berberis vulgaris</i> L.	12	10
<i>Betula papyrifera</i> Marsh.	1	-
<i>Betula pendula</i> Roth	62	51
<i>Bromus arvensis</i> L.	10	1
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	8	2
<i>Bromus inermis</i> Leyss.	21	4
<i>Bromus tectorum</i> L.	9	2
<i>Bryonia alba</i> L.	7	1
<i>Calamagrostis epigejos</i> (L.) Roth	22	30
<i>Campanula glomerata</i> L.	4	3
<i>Campanula medium</i> L.	2	-
<i>Campanula patula</i> L.	6	8
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	12	2
<i>Cardamine pratensis</i> L.	8	2
<i>Cardaminopsis arenosa</i> (L.) Hayek	12	9
<i>Carex digitata</i> L.	1	6
<i>Carex elata</i> All.	-	2
<i>Carex hirta</i> L.	2	3
<i>Carex nigra</i> Reichard	-	6
<i>Carex ovalis</i> Gooden.	1	-
<i>Carex remota</i> L.	-	3



Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Carex sylvatica</i> Huds.	6	19
<i>Carlina vulgaris</i> L.	2	-
<i>Carpinus betulus</i> L.	22	45
<i>Centaurea cyanus</i> L.	2	-
<i>Centaurea jacea</i> L.	4	1
<i>Centaurea scabiosa</i> L.	3	1
<i>Centaureum erythracea</i> Rafn	1	1
<i>Cerastium holosteoides</i> Fr. em. Hyl.	22	8
<i>Cerasus avium</i> (L.) Moench	26	8
<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. subsp. <i>acida</i> (Dumort.) Asch. & Graebn.	19	3
<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. subsp. <i>vulgaris</i>	17	2
<i>Chaerophyllum aromaticum</i> L.	2	4
<i>Chaerophyllum temulum</i> L.	18	12
<i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Scop.	6	3
<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert	8	1
<i>Chamomilla suaveolens</i> (Pursch) Rydb.	21	2
<i>Chelidonium majus</i> L.	39	7
<i>Chenopodium album</i> L.	19	6
<i>Cichorium intybus</i> L.	21	12
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	9	2
<i>Cirsium oleraceum</i> (L.) Scop.	4	14
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	7	3
<i>Consolida regalis</i> S.F. Gray	2	-
<i>Convallaria majalis</i> L.	11	23
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	17	6
<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Körte	22	10
<i>Corylus avellana</i> L.	20	37
<i>Corynephorus canescens</i> L.	7	2
<i>Cotoneaster dammeri</i> C. K. Schneid.	12	2
<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) DC.	12	10
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	16	12
<i>Cynosurus cristatus</i> L.	2	-
<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	23	24
<i>Dactylis glomerata</i> L.	9	16
<i>Dactylis polygama</i> Horv.	2	7
<i>Daucus carota</i> L.	12	1
<i>Deschampsia caespitosa</i> (L.) P. B.	4	14
<i>Deschampsia flexuosa</i> L.	12	23
<i>Dryopteris carthusiana</i> (Vill.) H. P. Fuchs	5	17

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Dryopteris dilatata</i> (Hoffm.) A. Gray	4	6
<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	10	19
<i>Echinops sphaerocephalus</i> L.	1	-
<i>Echium vulgare</i> L.	17	2
<i>Elymus repens</i> (L.) Gould	22	4
<i>Epipactis helleborine</i> (L.) Crantz	3	1
<i>Equisetum arvense</i> L.	9	2
<i>Equisetum hyemale</i> L.	2	1
<i>Equisetum palustre</i> L.	-	1
<i>Equisetum pratense</i> Ehrh.	6	2
<i>Equisetum sylvaticum</i> L.	6	6
<i>Erigeron canadensis</i> (L.) Cronquist	19	1
<i>Erigeron ramosus</i> (Walters) Britton, Sterns & Poggenb.	2	-
<i>Euonymus europaea</i> L.	6	8
<i>Euonymus fortunei</i> (Turcz.) Hand.-Mazz.	4	-
<i>Euphorbia cyparissias</i> L.	12	14
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	16	2
<i>Fagus sylvatica</i> L.	14	42
<i>Fallopia convolvulus</i> (L.) Á. Löve	4	2
<i>Festuca altissima</i> All.	3	12
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	6	3
<i>Festuca heterophylla</i> Lam.	1	8
<i>Festuca pratensis</i> Huds.	4	-
<i>Festuca rubra</i> L.	12	1
<i>Ficaria verna</i> Huds.	7	28
<i>Fragaria moschata</i> Weston	18	2
<i>Fragaria vesca</i> L.	12	4
<i>Frangula alnus</i> Mill.	21	22
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	7	6
<i>Fraxinus pennsylvanica</i> Marsh.	6	1
<i>Fumaria officinalis</i> L.	8	-
<i>Gagea lutea</i> (L.) Ker Gawl.	12	10
<i>Gagea minima</i> (L.) Ker Gawl.	2	1
<i>Galanthus nivalis</i> L.	24	4
<i>Galeobdolon luteum</i> Huds.	4	18
<i>Galeopsis speciosa</i> Mill.	6	8
<i>Galeopsis tetrahit</i> L.	12	18
<i>Galium aparine</i> L.	16	10
<i>Galium mollugo</i> L.	12	7

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Galium odoratum</i> (L.) Scop.	4	16
<i>Galium sylvaticum</i> L.	6	22
<i>Galium verum</i> L.	8	3
<i>Geum rivale</i> L.	2	12
<i>Geum urbanum</i> L.	8	8
<i>Glechoma hederacea</i> L.	22	8
<i>Hedera helix</i> L.	18	15
<i>Helianthus decapetalus</i> L.	7	-
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	12	2
<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	8	2
<i>Hemerocallis fulva</i> L.	2	-
<i>Hemerocallis thunbergii</i> Bak.	2	-
<i>Hepatica nobilis</i> Mill.	8	22
<i>Heracleum mantegazzianum</i> Sommier & Levier	4	2
<i>Heracleum sibiricum</i> L.	2	-
<i>Heracleum sphondylium</i> L.	11	3
<i>Hieracium lachenalii</i> C. C. Gmel.	4	12
<i>Hieracium murorum</i> L.	3	10
<i>Hieracium pilosella</i> L.	16	7
<i>Hieracium umbellatum</i> L.	7	4
<i>Humulus lupulus</i> L.	19	18
<i>Hypericum maculatum</i> Crantz	9	6
<i>Hypericum perforatum</i> L.	8	4
<i>Impatiens glandulifera</i> Royle	14	3
<i>Impatiens noli-tangere</i> L.	2	11
<i>Impatiens parviflora</i> DC.	34	78
<i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn.	10	1
<i>Juglans nigra</i> L.	4	-
<i>Juglans regia</i> L.	22	1
<i>Knautia arvensis</i> (L.) J. M. Coult.	12	5
<i>Lamium album</i> L.	25	3
<i>Lamium purpureum</i> L.	31	2
<i>Larix decidua</i> Mill.	26	17
<i>Lathyrus pratensis</i> L.	12	2
<i>Lathyrus sylvestris</i> L.	11	7
<i>Lathyrus tuberosus</i> L.	2	-
<i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh.	4	1
<i>Leonurus cardiaca</i> L.	11	2
<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.	14	2

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	23	4
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	12	-
<i>Lolium perenne</i> L.	33	1
<i>Lonicera xylosteum</i> L.	2	2
<i>Lycium barbarum</i> L.	4	1
<i>Lysimachia nummularia</i> L.	14	21
<i>Lysimachia vulgaris</i> L.	11	6
<i>Malus domestica</i> Borkh.	42	6
<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill.	12	2
<i>Malva alcea</i> L.	4	-
<i>Malva neglecta</i> L.	12	-
<i>Malva sylvestris</i> L.	2	-
<i>Medicago lupulina</i> L.	12	2
<i>Medicago sativa</i> L.	7	-
<i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke	10	8
<i>Melilotus alba</i> Medik.	14	6
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	8	2
<i>Mercurialis perennis</i> L.	24	26
<i>Moehringia trinervia</i> (L.) Clairv.	4	12
<i>Mycelis muralis</i> (L.) Dumort.	12	34
<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill	10	2
<i>Myosotis sylvatica</i> Hoffm.	9	2
<i>Narcissus poeticus</i> L.	3	-
<i>Oenothera biennis</i> L.	7	1
<i>Padus avium</i> Mill.	14	4
<i>Papaver argemone</i> L.	2	-
<i>Papaver rhoeas</i> L.	9	1
<i>Phalaris arundinacea</i> L.	-	1
<i>Philadelphus coronarius</i> L.	6	-
<i>Phleum pratense</i> L.	2	-
<i>Physocarpus opulifolius</i> (L.) Maxim.	3	-
<i>Picea abies</i> (L.) H.Karst	34	22
<i>Picea omorika</i> (Pančić) Purk.	2	-
<i>Picea pungens</i> Engelm.	2	1
<i>Picris hieracioides</i> L.	3	1
<i>Pinus sylvestris</i> L.	32	63
<i>Plantago lanceolata</i> L.	23	3
<i>Plantago major</i> L.	12	1
<i>Plantago media</i> L.	16	1

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Platanthera bifolia</i> (L.) Rich.	2	1
<i>Platanus</i> × <i>hispanica</i> Münchh.	3	-
<i>Poa annua</i> L.	27	2
<i>Poa nemoralis</i> L.	4	2
<i>Poa pratensis</i> L.	13	1
<i>Poa trivialis</i> L.	7	2
<i>Polygonum aviculare</i> L.	12	2
<i>Polygonum persicaria</i> L.	19	7
<i>Populus alba</i> L.	12	2
<i>Populus nigra</i> L.	9	2
<i>Populus nigra</i> L. 'Italica'	7	1
<i>Populus tremula</i> L.	35	23
<i>Potentilla anserina</i> L.	23	5
<i>Potentilla argentea</i> L.	6	-
<i>Potentilla reptans</i> L.	16	3
<i>Primula veris</i> L.	9	11
<i>Prunella vulgaris</i> L.	18	6
<i>Prunus domestica</i> L. subsp. <i>insititia</i> (L.) Fiori & Paoletti	17	2
<i>Prunus domestica</i> L. subsp. <i>domestica</i>	22	2
<i>Prunus domestica</i> L. subsp. <i>syriaca</i>	8	-
<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	17	37
<i>Prunus spinosa</i> L.	12	7
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco	16	14
<i>Pulmonaria obscura</i> Dumort.	2	7
<i>Pulmonaria officinalis</i> L.	12	4
<i>Pyrus communis</i> L.	22	2
<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	12	23
<i>Quercus robur</i> L.	16	28
<i>Quercus rubra</i> L.	14	12
<i>Ranunculus acris</i> L.	7	6
<i>Ranunculus auricomus</i> L.	5	7
<i>Ranunculus lanuginosus</i> L.	10	14
<i>Ranunculus repens</i> L.	15	14
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	6	-
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.	12	16
<i>Reynoutria sachalinensis</i> (F. Schmidt) Nakai	6	2
<i>Rhamnus cathartica</i> L.	14	4
<i>Ribes nigrum</i> L.	22	2
<i>Ribes rubrum</i> L.	30	1

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Ribes uva-crispa</i> L.	21	-
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	27	17
<i>Rosa canina</i> L.	19	2
<i>Rosa dumalis</i> Bechst. em. Boulenger	5	1
<i>Rosa glauca</i> Pourr.	1	-
<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	3	-
<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	1	-
<i>Rosa sherardii</i> Davies	1	-
<i>Rosa villosa</i> L.	2	-
<i>Rubus caesius</i> L.	21	20
<i>Rubus idaeus</i> L.	23	12
<i>Rubus nessensis</i> Hall	2	-
<i>Rubus plicatus</i> Weihe & Nees	12	8
<i>Rubus saxatilis</i> L.	2	5
<i>Rumex acetosa</i> L.	11	1
<i>Rumex acetosella</i> L.	15	3
<i>Rumex crispus</i> L.	3	-
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	7	-
<i>Salix alba</i> L.	6	1
<i>Salix aurita</i> L.	4	6
<i>Salix caprea</i> L.	10	15
<i>Salix cinerea</i> L.	22	14
<i>Salix fragilis</i> L.	12	8
<i>Salix pentandra</i> L.	7	2
<i>Salix purpurea</i> L.	4	4
<i>Sambucus nigra</i> L.	49	17
<i>Sambucus racemosa</i> L.	8	1
<i>Saponaria officinalis</i> L.	16	1
<i>Scrophularia nodosa</i> L.	6	12
<i>Scrophularia umbrosa</i> Dumort.	7	12
<i>Sedum acre</i> L.	12	7
<i>Sedum sexangulare</i> L.	15	3
<i>Silene otites</i> (L.) Wibel	2	1
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	12	8
<i>Solidago canadensis</i> L.	22	3
<i>Solidago gigantea</i> Aiton	48	5
<i>Solidago virgaurea</i> L.	4	13
<i>Sonchus arvensis</i> L.	23	7
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	21	2

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	48	36
<i>Sorbus intermedia</i> (Ehrh.) Pers	8	1
<i>Sorbus torminalis</i> L. (Crantz.)	5	2
<i>Spiraea japonica</i> L. f.	22	-
<i>Stachys sylvatica</i> L.	8	29
<i>Stellaria holostea</i> L.	12	16
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	22	12
<i>Stellaria nemorum</i> L.	2	8
<i>Symphoricarpos albus</i> (L.) S. F. Blake	26	4
<i>Symphytum officinale</i> L.	2	6
<i>Syringa vulgaris</i> L.	27	2
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	34	7
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.	66	8
<i>Taxus baccata</i> L.	4	2
<i>Thuja occidentalis</i> L.	8	-
<i>Thuja plicata</i> Donn ex D.Don	7	-
<i>Thymus pulegioides</i> L.	12	2
<i>Thymus serpyllum</i> L.	14	4
<i>Tilia × euchlora</i> K. Koch	4	-
<i>Tilia cordata</i> Mill.	34	12
<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	45	10
<i>Tragopogon pratensis</i> L.	3	-
<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	6	-
<i>Trifolium medium</i> L.	10	1
<i>Trifolium pratense</i> L.	22	2
<i>Trifolium repens</i> L.	26	1
<i>Tripleurospermum maritimum</i> (L.) W. D. J. Koch	7	-
<i>Tussilago farfara</i> L.	21	12
<i>Ulmus glabra</i> Huds.	32	21
<i>Ulmus laevis</i> Pall.	23	12
<i>Ulmus minor</i> Mill.	12	23
<i>Urtica dioica</i> L.	88	56
<i>Urtica urens</i> L.	56	12
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	14	44
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	18	34
<i>Valeriana officinalis</i> L.	12	5
<i>Verbascum phlomoides</i> L.	17	7
<i>Verbascum thapsus</i> L.	21	4
<i>Veronica chamaedrys</i> L.	21	12

Nazwa gatunkowa	Powierzchnie	
	Podstawowe	Referencyjne
<i>Veronica officinalis</i> L.	10	10
<i>Viburnum lantana</i> L.	11	2
<i>Viburnum opulus</i> L.	34	21
<i>Viccia cracca</i> L.	45	12
<i>Viccia hirsuta</i> (L.) Gray	12	2
<i>Viccia sepium</i> L.	32	11
<i>Viccia tetrasperma</i> (L.) Shreb.	22	2
<i>Vinca minor</i> L.	48	12
<i>Viola arvensis</i> Murray	12	2
<i>Viola odorata</i> L.	4	2
<i>Viola reichenbachiana</i> Jordan ex Bor.	12	10
<i>Viola riviniana</i> Rchb.	12	21

W obrębie niektórych sadyb widoczne są niewielkie oczka wodne lub pozostałości po nich, które zdradzają ukształtowanie terenu i występowanie gatunków pospolitych w środowiskach wilgotnych: *Carex nigra* Reichard, *Lysimachia vulgaris* L., *Valeriana officinalis* L., *Salix purpurea* L. Gatunki wilgotnych łąk i lasów występują we florze sadyb, które przylegają do cieków. W wielu miejscach widoczne są pozostałości po kwietnikach, skalniakach, trawnikach, łąkach i poletkach uprawnych. W granicach kilku dawnych nieruchomości odnaleziono warzywniki oraz fragmenty sadów owocowych. Około 25% flory stanowią gatunki pochodzące z dawnych nasadzeń. Są to głównie drzewa i krzewy owocowe, jak na przykład: *Malus domestica*, *Prunus domestica*, *Pyrus communis*, *Ribes nigrum* L., *R. rubrum* L., *R. uva-crispa* L., *Rubus caesius* L., *R. idaeus* oraz wieloletnie byliny ozdobne, pośród których warto wymienić gatunki z rodzaju *Aster* L. oraz *Vinca minor* L., który zanotowano w ponad połowie spisów florystycznych na powierzchniach podstawowych. Niektóre z leśniczówek, między innymi: *Forst Adamsdorf*, *Mienwald* oraz *Soldiner Stadt-Forst* były najprawdopodobniej zakładane w miejscach wcześniej zajętych przez starodrzew, o czym może świadczyć rozmieszczenie i wiek drzew.

Wiele posiadłości opuszczonych przez człowieka stało się składowiskiem odpadów, w miejscach tych pojawiają się gatunki nitrofilne: *Atriplex patula* L., *Arctium lappa* L., *A. minus* (Hill) Bernh., *Poa annua* L., *Urtica dioica* L., *U. urens* L. oraz ruderalne: *Elymus repens* (L.) Gould, *Erigeron canadensis* (L.) Cronquist, *Plantago major* L., *Stellaria media* L. czy *Taraxacum officinale* F.H. Wigg. Flora dawnych osad położonych w kompleksach lasów grądowych i bukowych z czasem



staje się podobna do przyległych fitocenoz. W przypadku opuszczonych sadyb leśnych, które znajdują się w otoczeniu monokultur świerkowych i sosnowych, obserwuje się powolne wnikanie głównie sosny, która tworzy jednogatunkowe płaty. Niezależnie od otoczenia, bardzo często obserwowano liczne odnowienie gatunków z rodzaju *Acer* L. Miejsca po dawnych osadach, szczególnie w sąsiedztwie zachodniej granicy Polski, były wielokrotnie penetrowane przez poszukiwaczy kosztowności – świadczą o tym liczne odkrywki. Drzewa rosnące w osadach położonych w pobliżu dróg są czasem pozyskiwane na opał. W ostatnim roku prac terenowych wiele starych drzew uległo zniszczeniu na skutek silnych wiatrów. Gatunki obce, wprowadzone do zbiorowisk leśnych przez człowieka, rzadko pojawiają się na powierzchniach referencyjnych, ich występowanie ogranicza się do pojedynczych osobników, rosnących zazwyczaj w pobliżu granicy opuszczonej osady. Tereny po dawnych leśniczówkach oraz osadach w kilku miejscach zajęła infrastruktura turystyczna. W granicach większych nieruchomości, zadrzewienia mają zazwyczaj charakterystyczny wygląd, główne miejsce zajmują rosnące pojedynczo lub w grupie lipy, niekiedy dęby, buki, kasztanowce, daglezie lub klony. W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że flora dawnych osad leśnych nie różni się znacząco od flory występującej w przyległych kompleksach leśnych. W miejscach dobrze nasłonecznionych, na żyznych glebach, często pojawia się odnowienie złożone z leszczyzny, niektóre z nich osiągają znaczne przyrosty. Krzewy ozdobne, wśród których licznie występują *Syringa vulgaris* L. i śnieguliczka biała *Symphoricarpos albus* (L.) S. F. Blake, sadzono niegdyś w postaci żywopłotów będących otuliną samych zabudowań, nie zaś całej sadyby. Szczególnie w poniemieckich leśniczówkach dużą popularnością cieszyły się ozdobne róże, które sadzono zazwyczaj grupowo w centralnej części osady lub pod murami budynków. W granicach sadyb napotkano również rośliny pnące, które wspinają się na pozostałości murów, płotów i słupów. Pomimo upływu kilkudziesięciu lat od zakończenia II wojny światowej, kiedy wiele osad leśnych zostało opuszczonych, liczne gatunki roślin wieloletnich nadal występują we florze sadyb. Z grupy tej najczęściej notowano gatunki z rodzaju aster: *Aster amellus* L., *A. novae-angliae* L., *A. novi-belgii* L. oraz *Hemerocallis fulva* L., *Helianthus decapetalus* L., *Narcissus poeticus* L., *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, *Saponaria officinalis* L. Gatunki te zajmują również znaczne powierzchnie w badanych obiektach, wykraczając bardzo często swoim zasięgiem poza granice sadyb.

## 5. Dyskusja

Dawne osady leśne stanowią miejsca charakteryzujące się dużą różnorodnością gatunkową – w porównaniu z florą powierzchni referencyjnych. W granicach dawnych nieruchomości na terenach leśnych tworzą się niewielkie strefy ekotonowe, złożone głównie z gatunków charakterystycznych dla zbiorowisk leśnych, łąkowych i ruderalnych. Opuszczone osady leśne stanowią refugium wielu rodzimych gatunków drzew, krzewów oraz roślin zielonych. Obce gatunki roślin naczyniowych wprowadzone przez człowieka w zależności od swoich właściwości biologicznych i ekologicznych, w różnym stopniu i czasie rozprzestrzeniają się w zbiorowiskach leśnych. Niektóre gatunki szybko tworzą wtórne populacje na terenach leśnych, natomiast inne taksony znacznie wolniej poszerzają swój areal występowania. Rozprzestrzenianie się inwazyjnych gatunków drzew i krzewów jest wynikiem zaburzeń w zbiorowiskach leśnych. W lasach zbliżonych do naturalnych, rzadko dochodzi do rozprzestrzeniania się inwazyjnych taksonów.

Można stwierdzić z dużą pewnością, że obecny stan wiedzy o gatunkach obcych w środowisku leśnym jest wystarczający do tego, aby ocenić korzyści i straty wynikające z wprowadzania obcych gatunków drzew do ekosystemów leśnych. Zwalczanie gatunków inwazyjnych należy prowadzić w umiarkowany sposób, z uwzględnieniem metod niepowodujących dodatkowych strat w środowisku. We florze opuszczonych osad leśnych pojawiają się również gatunki objęte ochroną, takie jak: *Epipactis helleborine* (L.) Crantz i *Platanthera bifolia* (L.) Rich.

Flora opuszczonych osad leśnych rzadko jest przedmiotem badań florystycznych. Pojedyncze wzmianki o niezamieszkałych osadach pojawiają się w programach ochrony przyrody nadleśnictw lub nielicznych publikacjach z tego zakresu. Podejmowanie dalszych badań w tym zakresie wydaje się być właściwym kierunkiem, który pozwoli lepiej poznać roślinność obszarów leśnych.

## Literatura

- Atlas klimatycznego ryzyka uprawy roślin w Polsce*. 2001. Koźmiński C., Michalska B. (red.) Wyd. AR, Szczecin.
- Atlas podziału hydrograficznego Polski*. 2005. Czarnecka H. (red.) Wyd. IMGW, Warszawa.
- Bacieczko W., Kochanek A. 2009. Pojezierze Myśliborskie, charakterystyka geobotaniczna. Wyd. Oficyna IN PLUS, Szczecin.
- Borówka R. K. 2005. Budowa geologiczna i rozwój rzeźby Pomorza Zachodniego. [W:] Borówka R. K., Musielak S. (red.). Środowisko przyrodnicze wybrzeży Zatoki Pomorskiej i Zalewu Szczecińskiego. Wyd. Oficyna In Plus, Szczecin. 6–105.

- Borówka R. K. 2005. Budowa geologiczna i rozwój rzeźby Pomorza Zachodniego. [W:] Borówka R. K., Musielak S. (red.). Środowisko przyrodnicze wybrzeży Zatoki Pomorskiej i Zalewu Szczecińskiego. Wyd. Oficyna In Plus. Szczecin. 6–105.
- Danielewicz W., Wiatrowska B. 2014. Inwazyjne gatunki drzew i krzewów w lasach Polski, Peckiana.
- Hutnikiewicz A. 1999. Pomorze Zachodnie po II wojnie światowej. [W:] J. M. Piskorski (red.).
- Pomorze Zachodnie poprzez wieki*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin. 107–131.
- Jasnowska J. 2002. Świat roślin. [W:] Kaczanowska M. (red.). Przyroda Pomorza Zachodniego. Oficyna in plus. Szczecin.
- Klimek H. 1995. Z nakazu pracy. Wydawnictwo Sylwiana. Szczecin.
- Kondracki J. 2000. Geografia regionalna Polski. PWN. Warszawa.
- Kondracki J. 2009. Geografia regionalna Polski. PWN. Warszawa.
- Jankowiak S. 2002. Wysiedlenie Niemców z województwa szczecińskiego w latach 1945–1950. [W:] Kozłowski K. (red.). Osadnictwo polskie na Pomorzu Zachodnim. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego. Szczecin. 2–37.
- Libbert W. 1941. Flora des Kreises Soldin in der Neumark. Verhandlungen Botanischen Vereines Province Brandenburg. 81: 1–139.
- Matuszkiewicz J. M. 1993. Krajobrazy roślinne i regiony geobotaniczne Polski. Prace Geograficzne IgiPZ PAN. 158: 1–107.
- Matuszkiewicz J. M. 2008. Regionalizacja geobotaniczna Polski. IGiPZ PAN. Warszawa.
- Myśliwy M. 2003. Flora roślin naczyniowych Barlinecko-Gorzowskiego Parku Krajobrazowego w warunkach antropogenicznych przemian środowiska przyrodniczego. Katedra Taksonomii Roślin i Fitogeografii. Uniwersytet Szczeciński (mscr.).
- Tokarska-Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C. 2012. Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych [Alien plants in Poland with particular reference to invasive species]. Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska. Warszawa.
- Żukowski W., Jackowiak B. 1995. Lista roślin naczyniowych ginących i zagrożonych na Pomorzu Zachodnim i w Wielkopolsce. [W:] Żukowski W., Jackowiak B. (red.). Ginące i zagrożone rośliny Pomorza Zachodniego i Wielkopolski. Prace Zakładu Taksonomii Roślin UAM. Bogucki Wydawnictwo Naukowe. Poznań. 3: 9–95.

# 12 System of teaching master's degree biologists at the Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus

Sergey **Dromashko**

Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus  
1 Knorina Street., 220049 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: S.Dromashko@igc.by

**Abstract:** The Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus (NAS of Belarus) is an institution offering master's and doctor's degree courses. Master's degree courses are available in science I (physics, chemistry, biology), technology (applied mathematics and computer science, mechanical engineering and machine science) and humanities (sociology, economics and management of the national economy, archeology, art history). As an institution under the auspices of the NAS of Belarus, the Graduate School uses all intellectual, technical and technological resources of the Academy. Leading academic scientists deliver lectures, supervise master's theses realized on the basis of academic research institutions and centers. There are two components of master's education syllabus obligatory (State) and additional (Graduate School). The obligatory component, common for all specialties, includes such disciplines as Informatics, History of Philosophy, Foreign Language and Belarusian Language. One of the branches of the Natural Science Department is biology. The State component in biology consists of several disciplines: Modern Problems of Biology, Bases of Neurobiology, Cell Biology, Epigenetics. The Graduate School component consists of such disciplines as Genomics and Biotechnology, Bioinformatics and Mathematical Biology, Applied Microbiology, Biotechnology in Aquaculture, Innovative Biotechnologies for the Pharmaceutical and Agrarian Industries, Human Genetics and its Medical Applications, Physical and Chemical Basis of Life, etc.

**Keywords:** Graduate School, master programmes, natural and technical sciences, master's degree biologists

## 1. Introduction

The Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus (NAS of Belarus) is an institution offering master's and doctor's degree courses. Master's degree courses are offered in natural sciences (physics, chemistry, biology), technical sciences (applied mathematics and computer science, mechanical engineering and machine science) and humanities (sociology, economics and management of the national economy, archeology, art history).

The Graduate School has received a license for running master's degree courses in the specialization of Additive Technologies (i.e. 3D printing). Recently the application to the Ministry of Education has been prepared for opening of a master's degree course in Biological Diversity and Sustainable Development.

There are two components of master's degree education: obligatory (State) and additional (Graduate School). The obligatory component, common for all specializations includes such disciplines as Informatics, History of Philosophy, Foreign Language and Belarusian Language. This component also includes disciplines that allow master's students to gain in-depth knowledge in their selected field of science (physics, biology, archeology, etc.). As an institution under the auspices of NAS of Belarus, the Graduate School uses all intellectual, technical and technological resources of the Academy. Leading academic scientists deliver lectures, supervise master's and doctoral degree theses on the basis of academic research institutions and centers.

To help master's degree students, the Graduate School professors and teachers have developed an original system of teaching aids, including electronic educational and methodical complexes. Most of them are authorized for use at the Republic-wide level by the Ministry of Education.

## 2. Natural Sciences Department

The main direction of work at the Natural Sciences Department is "Developing of Conceptual Bases for Training of Scientific Personnel for Research and Innovation in the Field of Natural and Technical Sciences". Within the framework of this direction, a new training model for scientific personnel of the university type for the master's degree in Biology, Physics, Chemistry, Mechanical Engineering and Machine Science specialties has been prepared. In 2013-2018, the syllabus for graduate students of the department including the following subjects.

- Modern Concepts of the Structure of Matter (physics), Modern Problems of Chemistry (chemistry), Modern Problems of Biology (biology), Scientific Foundations of Engineering Technology (mechanical engineering and machine science) – State component;
- Modern Problems of Applied Physics (physics), Structure and Reactivity of Organic Compounds (chemistry), Genomics and Biotechnology (biology), Bioinformatics and Mathematical Biology (biology), Surface Engineering and Nanostructured Materials (mechanical engineering and machine science) – Graduate School component.

Taking into account the current trends in the development of natural and engineering sciences and the need of the country for highly competent personnel, new disciplines' curricula for master's degree courses are being developed. Among them, for example, are Epigenetic, Fundamentals of Neurobiology, Applied Microbiology, Biotechnology in Aquaculture, Innovative Biotechnologies for Pharmaceutical and Agrarian Sectors, Human Genetics and its Medical Applications (biology), Physics of Wave Processes, Nonlinear Physics, Methods of Molecular Dynamics, Physics of Nanostructures (physics), Theoretical Bases of Adsorption, Membranes and Membrane Technologies, Fundamentals and Application of Nanostructured Systems, Catalytic Methods of Modern Organic Chemistry, Computer Modeling of Drugs (chemistry), etc.

### 3. New Master's degree courses

The concept and methodological support for a new innovative master's degree course in the specialization in "Additive Technologies" was developed. 3D printing is an innovative technology that has a wide range of applications: from mechanical engineering and construction to biotechnology and medicine. At the initiative of the Graduate School, the specialization was included in the National Register of the Republic of Belarus OKRB 011-2009 "Specialties and Qualifications". By order of the Ministry of Education of the Republic of Belarus, the Graduate School of NAS of Belarus has organized courses in the specialization of "Additive Technologies".

Currently, a new practice-oriented master's degree course in "Biological Diversity and Sustainable Development" is developed. The United Nations Conference on Environment and Development (Rio de Janeiro, 1992) recognized that conservation and rational use of natural resources, in particular biological diversity, is one of the main mechanisms for preventing a worldwide environmental catastrophe and ensuring sustainable development. At the United Nations Sustainable

Development Summit held on September 25–27, 2015 (New York), the UN member states adopted the Sustainable Development Agenda for the period up to 2030, which among 17 Sustainable Development Goals aimed at eliminating poverty, combating inequality and injustice, and also addressing climate change issues includes ensuring the availability and rational use of water and sanitation for all (Goal 6) and protecting and restoring terrestrial ecosystems and promoting their rational use, forest management, combating desertification, ending and reversing land degradation and halting the loss of biodiversity (Goal 15). Opening the specialty “Biodiversity and Sustainable Development” at the second stage of higher education at the National Academy of Sciences of Belarus will provide training for highly qualified specialists in key areas of sustainable development: management of specially protected natural areas, crop and livestock, hunting and provision of services in this area, forestry, fishing and fish farming, environmental monitoring, etc.

There are 64 master’s degree courses in this direction at US universities. In Europe, there are only two: in Sweden (the Ecology and Biodiversity course at the University of Stockholm) and the Czech Republic (the Nature Conservation course at the Czech University of Life Sciences, Prague). The Russian Federation has recently opened master's degree courses on biodiversity in St. Petersburg and Vladivostok.

#### 4. Educational and Teaching Manuals of the Department

In order to actively develop professional competencies of master’s degree students, the Department professors have proposed a series of electronic educational and methodological courses in: Modern Problems of Biology, Genomics and Biotechnology, Bioinformatics and Mathematical Biology (biology), Modern Problems of Chemistry, Structure and Reactivity of Organic Compounds (chemistry), Modern Concepts of the Structure of Matter, Modern Problems of Applied Physics (physics), Scientific Foundations of Engineering Technology, Surface Engineering and Nanostructured Materials (mechanical engineering and machine science). These courses are registered in the State Register of Information Resources. In 2017, the electronic course “Genomics and Biotechnology” was classified as an electronic textbook by the Ministry of Education of the Republic of Belarus.

## 5. Achievements of Master's degree Students

The Department uses the possibilities of the new magazine "The Master's Herald: a Collection of Papers by Graduate Students and Masters" edited by I. I. Gancherenok for the development and activation of the publication potential of master's degree students. Thus, in the academic year 2016/2017, 11 articles were published by students working towards MSc degree at the Department. In the academic year 2017/2018 - 8 articles were published. Table 1 shows the distribution of publications of master's students by the branches of science. It shows that the students of biology displayed the greatest activity in publishing as their works account for 60% of the published scientific students' works.

As a part of the educational institution of NAS of Belarus, the Department has a unique opportunity to use the scientific and technical base and human resources of all the institutions and centers of the Academy of Sciences to train highly qualified, competent academic workers. At the Master's degree Students, leading scientists - academicians, corresponding members, doctors of science, and doctors of philosophy develop educational and teaching complexes and lead the preparation of master's theses in such specialties as mechanical engineering and machine science, physics, chemistry and biology. The subjects of master's degree theses are closely linked with the main directions of scientific, technical and innovation policy of our state. This is confirmed by multiple awards won by the students and graduates of the master's degree courses at annual Republican competitions of student works.

**Table 1.** Publications of students and graduates of the Natural Science Department in "The Master's Herald"

	Physics	Chemistry	Biology	Mechanical Engineering and Machine Science
2016	2	2	6	1
2017	2	–	5	1

Annually, scientific works of master's degree students and graduates in all 4 specialization assigned to the Department are submitted to the Republican competition of students' scientific works of the Republic of Belarus. In the 2017 competition, out of 25 winners from the Graduate School, 18 were students and graduates of the Department. The quantitative data on all the competitions for the last 5 years are presented in Table 2.



**Table 2.** Participation of students and graduates of the Natural Sciences Department in the Republican competitions of students' scientific works

	Physics	Chemistry	Biology	Mechanical Engineering and Machine Science
2013	I category – 1	–	III category – 1	–
2014	I category – 1	I category – 2	–	II category – 1
2015	II category – 1	I category – 1	–	–
2016	I category – 1	Laureate – 1	I category – 1	II category – 1
	III category – 1		II category – 4	
2017	I category – 2	I category – 1	Laureate – 1	II category – 1
	II category – 2		I category – 5	III category – 2
	III category – 1		III category – 3	

A high professional level of the students of the Department is also confirmed by a large number of publications on their research results appearing in prestigious specialized scientific journals in the country and abroad (more than 150 articles, reports and abstracts for 2013–2017 in total). In 2013–2017, students also participated in international conferences in Belarus, Russia and other countries of Commonwealth of Independent States (CIS) and European Union (EU).

## 6. International Cooperation

Developing and strengthening international relations with educational centers of such countries as Russia, Armenia, Vietnam, Iran, China, and Sudan contributed to the creation of a synergetic model of a higher educational institution of the university type. So in 2017, within the framework of expanded export of educational services, two agreements were concluded on the joint preparation of master's degree students with the educational centers of China. In 2018, a collaboration agreement was concluded with the Bialystok University of Technology (Bialystok, Poland) and the agreement with the Vytautas Magnus University (Kaunas, Lithuania) is at its conclusion stage. This will contribute to the inclusion of the Graduate School of NAS of Belarus in the European Higher Education Area.

In this regard, the scientific and innovative activities of the Department are aimed at systematically increasing the export of educational services both within the framework of the Eurasian Economic Union and far abroad. The Department trained master's degree biology students from Libya, in 2017–2018 defended PhD

theses. Currently, a master's degree student in chemistry from Syria is undergoing training.

We do not forget about collaborations with Russia. In 2018, with a view to increase the competitive abilities the master's students of the Department, they were given an opportunity to take distance learning on the issues of standardization and certification of nanotechnology products organized by the ROSNANO Group (Russia). As a result of passing the exam conducted by the representatives of the Foundation for Infrastructure and Educational Programs and the Center for Qualification Assessment in the Nanoindustry of the ROSNANO Group in Minsk, 14 undergraduates received the corresponding Russian certificates. Although these documents are not official, their availability increases the chances of master's degree graduates to have a good career development in future. The experience gained gave rise to the idea that an additional special course on standardization involving specialists from the State Committee for Standardization of the Republic of Belarus should be introduced into the curriculum of master's degree students in natural and engineering sciences.

The development of syllabuses of international schools in the areas of modern natural sciences is a new model of international collaboration. Thus, the concept and program of the joint Belarusian-German summer school "Biotechnology for Human Well-Being: Medicine, Sport, Safety" have been developed on the basis of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. It is planned to organize a similar school for master's degree students from CIS countries addressed to Polish and Lithuanian listeners.

## 7. Institute of Genetics and Cytology in Teaching of Master's Degree Biology Students

The choice of summer school subjects and its location is not accidental. Genetics, as well as its modern genomics, are the leading sciences of the 21<sup>st</sup> century that determine the possibilities of promising areas of biotechnology. Therefore, it is not surprising that a significant number of master's degree biology students, both domestic and foreign, from Libya over 60 for all the years, passed specialization and prepared their theses at the Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus. Table 3 shows changes in the number of master's degree biology students in years 2007–2017.

**Table 3.** Changes in the number of master's degree students in biology over 2007–2017, including those who prepared theses at the Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus

Years of admission	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Master's students, total	14	19	17	26	32* (8 foreigners)	24	13	19	20	29	27
of which Institute of Genetics and Cytology	5	6	6	9	12* (5 foreigners)	6	5	2	6	2	5

\* Taking into account foreign students who studied for 2 years (2010–2012)

Among them, five students (including one from Libya) prepared and defended their master's degree theses under my scientific guidance on the basis of a genetic modelling laboratory. Another three master's degree students had supervisors from my laboratory.

As a rule, the subject of master's degree studies was related to the current trends in fundamental and applied research of the Republic of Belarus determined by the Council of Ministers of our country for the corresponding five-year plan:

- Genomics of Plants and Animals, Use of Microorganisms, Plant and Animal Cells in Biotechnological Processes, New Methods of Diagnosis, Prevention and Treatment of Human Diseases (2006–2010);
- Genetics and Genomics of Plants, Animals, Microorganisms and Humans, Biosafety of Transgenic Organisms and their Components for Human Health, Animals and the Environment, Identification and Mapping of Genes Using DNA Technologies, DNA Technologies and Genetic Engineering Methods in the Diagnosis and Treatment of Human and Agricultural Animal Diseases (2011–2015);
- Biological Systems and Technologies, Medicine and Pharmacy, Ecology and Nature Management (2016–2020).

The distribution of master's theses subjects by individual research areas is given in Table 4.

**Table 4.** Distribution of master's theses defended in genetics, genomics and biotechnology for the years 2008-2017

Objects of research			
microorganisms	plants	animals	humans
genetics of soil bacteria	genetics and genomics of agricultural plants	genetics and genomics of agricultural animals	medical genetics
	genetic engineering	genetics of wild animals	sports genetics

## 8. Conclusions

The above data confirm the important role the collaboration of the Graduate School with the leading institutions and centers of the National Academy of Sciences plays in the scientific and technological development of our country. Graduates who study at the Natural Sciences Department and prepare their theses on the basis of NAS of Belarus are getting highly motivated and become competent specialists contributing to the Belarusian economy already at the learning stage.