



Zastosowanie kultur *in vitro* w ochronie rzadkich i ginących gatunków paproci serpentynitowych z Dolnego Śląska

Jowita Marszał, Krystyna Kromer

Pracownia Kultur Tkankowych, Ogród Botaniczny, Uniwersytet
Wrocławski, Wrocław

The application of the tissue cultures in protection of rare and threatened species of ferns from Lower Silesia

Summary

One of the possibilities of the conservation biology is the *in vitro* culture method. The usefulness of *in vitro* culture methods of spore planting and prothallium storage of rare, threatened and protected fern species were tested.

Spores of *Asplenium aduterinum*, *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* and *Polypodium vulgare* were collected from sporophytes growing in the natural habitats of Lower Silesia area in 1996. The collected spores were disinfected and the aseptic spores were cultured in flasks containing 1/4 MS solid medium. After three to eight months, the spores germinated, giving rise to a filamentous gametophytes. Six to eight months later, sporophytes could be observed in these cultures.

The *in vitro* method gives the possibility to investigate the special characteristics of life cycle and breeding system of fern species. It is possible to collect fern spores from natural habitats and use them to obtain populations, which will allow to preserve the fern population in cultivation in the Botanical Garden of the Wrocław University.

Key words:

serpentine ferns, *Asplenium aduterinum*, *A. cuneifolium*, *in vitro*, propagation.

Adres do korespondencji

Jowita Marszał-Jagacka,
Pracownia Kultur
Tkankowych,
Ogród Botaniczny,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Sienkiewicza 23,
50-335 Wrocław.

1. Wstęp

Paprocie stanowią niejednorodną grupę, reprezentowaną w większości przez wysokie poliploidy oraz formy mieszańcowe, międzygatunkowe i międzyrodzajowe (1). W Polsce występuje

45 gatunków paproci na terenie całego kraju, z czego aż 21,7% zaliczanych jest do paproci wymarłych (4,3%), wymierających (4,3%), narażonych (8,7%), rzadkich (2,2%) i zagrożonych (2,2%) (1-2). Wśród paproci narażonych na wyginięcie występują paprocie serpentynitowe. Według ostatnich doniesień stanowiska serpentynitowe, na których występują te paprocie, ulegają zubożeniu ilościowemu i jakościowemu (3-6).

W Polsce skały serpentynitowe można spotkać jedynie na terenie Dolnego Śląska, a ich największe skupienia znajdują się na północ od Janowic Wielkich, na wzgórzach koło Kiełczyna, w Masywie Ślęży (Sobótka i Góra Radunia), na południe od Ząbkowic Śląskich oraz na północny wschód od Kłodzka (7).

Na stanowiskach serpentynitowych można znaleźć rzadkie gatunki roślin. Wśród nich występują pewne gatunki paproci z rodzaju *Asplenium*, których zasięg występowania w Polsce ograniczony jest tylko do podłoża serpentynitowego (8). Do paproci tych, nazywanych paprociami serpentynitowymi, zalicza się zanokcicę serpentynową *A. adulterinum* Milde, ciemną *A. adiantum-nigrum*, klinowatą *Asplenium cuneifolium* Viv. i kończystą w odmianie śląskiej *A. onopteris* var. *silesiaca* Milde. Paprocie te rosną w szczelinach skalnych tworząc niewielkie skupienia, zasiedlając rozproszone i izolowane stanowiska. Duża część roślin z obszarów serpentynitowych uważana jest za gatunki endemiczne, a wśród nich za relikty glacialne Europy Środkowej uważane są *Asplenium adulterinum* i *Asplenium cuneifolium* (9-10). Wszystkie wymienione gatunki paproci serpentynitowych znajdują się na „Czerwonej liście roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce” (11), a trzy z nich *Asplenium adulterinum*, *A. adiantum-nigrum* i *A. cuneifolium* zostały umieszczone w *Polskiej czerwonej księdze roślin* (6), jako gatunki zagrożone wyginięciem (EN).

Kultury *in vitro* są bardzo dobrym sposobem rozmnażania wielu gatunków roślin, zwłaszcza gatunków sprawiających trudności przy rozmnażaniu generatywnym, ponadto pomagają poznać wymogi żywieniowe, a także cykl życiowy roślin. Cousins i in. (12) podają, że większość gametofitów paproci ginie w warunkach *in situ*. Często przedrośla nie przeżywają najbardziej krytycznych faz rozwojowych takich jak: kiełkowanie spor, wzrost przedrośli, zapłodnienie i rozwój młodego sporofitu.

Badania prowadzone były w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego dotyczyły dwóch gatunków paproci serpentynitowych *Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium* oraz paproci nie związanych z serpentynitami, ale również na nich występującymi *Asplenium septentrionale* i *Polypodium vulgare*. Celem badań prowadzonych w Pracowni Kultur Tkankowych Wrocławskiego Ogrodu Botanicznego było poznanie wymogów żywieniowych, cyklu reprodukcyjnego oraz całego cyklu życiowego zagrożonych gatunków paproci.

2. Materiał i metody

Materiałem do badań były dojrzałe i żywotne zarodniki 4 gatunków paproci, zebrane ze stanowisk ich naturalnego występowania w 1996 r. *Asplenium cuneifolium*

z Książnicy i Przemysłowa, *A. adulterinum* z Książnicy, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare* z Osoli. Kultury gametofitów wyprowadzano według wcześniej opisanej metody Marszał i Kromer (13).

W doświadczeniach porównywano wzrost i rozwój gametofitów czterech gatunków paproci rosnących na pożywce mineralnej MS stosowanej w rozcieńczeniach 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 i zmodyfikowanej – zawierającej niższe dawki agaru ($6,8 \text{ g/dm}^3$) i sacharozy (20 g/dm^3), wyższe pH 6,8-7,0, zmienione proporcje makroelementów oraz o połowę mniej glicyny.

W doświadczeniach używano makroelementów Murashige i Skooga (14) w rozcieńczeniu do 1/2. Pożywkę zestalano agarem (8 g/dm^3), a stężenie sacharozy wynosiło 30 g/dm^3 . Pojedyncze przedrośla stadium sercowatego *Asplenium adulterinum*, *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare* umieszczano w kolbkach o pojemności 100 ml, zawierających 35 ml pożywki. Doświadczenie przeprowadzono w czterech powtórzeniach. Powtórzenie stanowiła próba 10 gametofitów. Kultury umieszczano w pokoju hodowlanym o temperaturze 18-20°C przy oświetleniu wynoszącym $14,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ i 16-godzinnym fotoperiodzie.

Po pięciu tygodniach od daty założenia doświadczenia określano szacunkowo procent obumarłych przedrośli. Po kolejnych pięciu tygodniach oceniano świeżą masę i liczbę przedrośli badanych gatunków paproci.

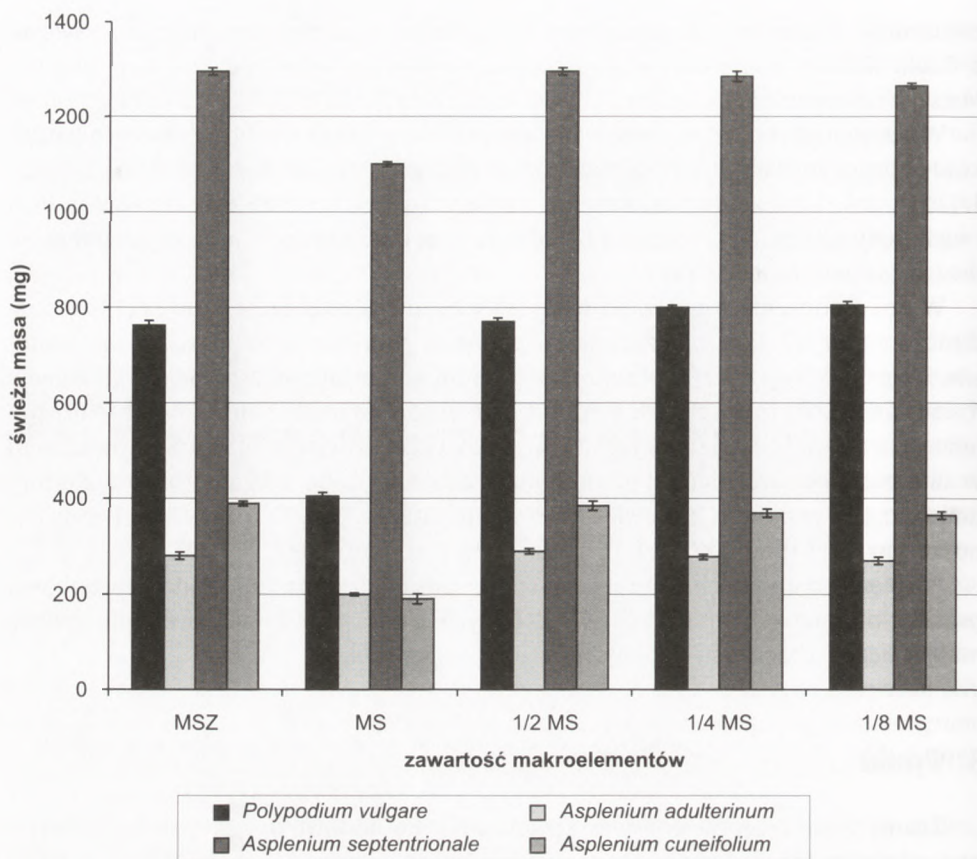
3. Wyniki

Znany wiele receptur pożywek stosowanych do hodowli *in vitro* paproci. W przeprowadzonym doświadczeniu przetestowano wpływ pożywki MS stosowanej w rozcieńczeniach 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 i pożywki MS zmodyfikowanej specjalnie dla paproci serpentynitowych. Zawierała ona niższe dawki agaru ($6,8 \text{ g/dm}^3$) i sacharozy (20 g/dm^3), wyższe pH 6,8-7,0, zmienione proporcje makroelementów oraz o połowę mniej glicyny.

Porównując wzrost i rozwój przedrośli wszystkich badanych gatunków paproci, stwierdzono, że najodpowiedniejszą była pożywka zawierająca 1/2 makroelementów MS. Świeża masa przedrośli na tej pożywce była najwyższa (rys.). Zbliżone wyniki uzyskano na zmodyfikowanej pożywce MS. Gametofity rosnące na tych dwóch pożywkach (1/2 MS i MSZ) miały prawidłowy pokrój i wytworzyły największą liczbę przedrośli I rzędu.

Świeża masa przedrośli rozwijających się na pożywce o pełnym stężeniu soli (makroelementów) była niższa, a liczba przedrośli I rzędu była najniższa u wszystkich gatunków (rys.). Pełne stężenie soli w pożywce MS powodowało obumieranie gametofitów. Najbardziej wrażliwe na zasolenie okazały się przedrośla *Asplenium cuneifolium* (zamieranie 50% przedrośli), natomiast najmniej wrażliwe były przedrośla *A. septentrionale* (zamieranie 10% przedrośli).

Najniższe ze stosowanych stężeń makroelementów (1/8) w pożywce MS wykazywało działanie hamujące wzrost u niektórych badanych gatunków. Spadała liczba



Rys. Wpływ pożywki MS i jej modyfikacji na wzrost i rozwój przedrośli *Polypodium vulgare*, *Asplenium aduterinum*, *Asplenium septentrionale* i *Asplenium cuneifolium* po 2 miesiącach kultury.

przedrośli I rzędu u *Asplenium septentrionale* i zmniejszała się świeża masa u *A. cuneifolium* (rys.). Na pożywce z 1/8 MS następowało zdrobnienie przedrośli (*A. aduterinum* i *A. cuneifolium*), na których rozwijała się znacznie większa niż na innych pożywkach liczba chwytників (*Polypodium vulgare*). Z uwagi na niską zawartość soli w pożywce 1/8 MS, aby zapobiec obumieraniu przedrośli, konieczne było częste ich pasażowanie.

4. Dyskusja

Najważniejszy dla prawidłowego wzrostu i rozwoju gametofitów był skład pożywki. Takie czynniki jak optymalna temperatura i natężenie światła wpływały na efektywne odżywianie się i rozwój przedrośli paproci w kulturach *in vitro* (15). Poziom makroelementów w różny sposób wpływał na rozwój gametofitów badanych

gatunków paproci. Najlepszy przyrost biomasy obserwowano na pożywce MS, w której makroelementy rozcieńczano do 1/2 ich pierwotnego stężenia. Równie korzystna była pożywka zmodyfikowana MSZ o składzie makroelementów zbliżonym do stężenia składników na podłożu serpentynitowym. Gametofity rosnące na tych stężeniach pożywek rozwijały się prawidłowo i dość wczesnie wytwarzały sporofity. Zenkteler (16) do testowania wpływu zróżnicowanego poziomu makroelementów w pożywce na kiełkowanie zarodników, przyrost świeżej masy i rozwój przedrośli *Matteuccia struthiopteris* stosowała pożywki Hoaglanda, Knopa, Knudsona i White'a. W jej doświadczeniach pożywki Knopa i Knudsona stosowane w 1/2 ich stężenia okazały się najodpowiedniejszymi pożywkami. W swoich badaniach Zenkteler (1) przetestowała wpływ zróżnicowanych stężeń makroelementów i mikroelementów MS (1/4, 1/2 i pełne stężenie makroelementów) w pożywce MFMM na przeżywalność przedrośli 8 gatunków paproci. Najlepsze dla rozwoju przedrośli, podobnie jak w przypadku doświadczeń prowadzonych na różnych gatunkach paproci, okazało się rozcieńczenie makroelementów do 1/2.

Do rozmnażania gametofitów i sporofitów *Asplenium nidus* (17) oraz *Blechnum spicant* i *Pteris ensiformis* (18) Fernandez i in. zastosowali pożywkę Murashige i Skooga (14) w pełnym składzie makroelementów, która okazała się przydatna dla namnażania wymienionych gatunków paproci. Dla badanych gatunków paproci pełne stężenie soli mineralnych zastosowanych w pożywce MS było mniej korzystne, a nawet wpływało na zamieranie przedrośli paproci. Najbardziej wrażliwe na zasolenie okazały się przedrośla *Asplenium cuneifolium* (zamieranie w 50%), natomiast najmniej wrażliwe były przedrośla *A. septentrionale* (zamieranie w 10%). Koresponduje to z wynikami otrzymanymi przez Fernandez i in. (19), którzy badali wpływ pożywki Knopa (20), Knudsona (21), Klekowskiego (22) i Murashige i Skooga (14) w pełnym składzie makroelementów i w rozcieńczeniu do 1/2 i 1/4 na przyrost świeżej i suchej masy gametofitów *Blechnum spicant*. W otrzymanych wynikach wskazuje się, że wyższe stężenia soli w pożywce (1/1 i 1/2 MS) wpływały korzystnie na przyrost świeżej masy i zwiększały suchą masę przedrośli *Blechnum spicant*, ale wstrzymywały formowanie się plemni i rodni. Pożywki ubogie w sole mineralne (pożywki Knopa, Knudsona i Klekowskiego), a szczególnie pożywka Klekowskiego (22), hamowały wzrost gametofitów, ale stymulowały powstawanie gametangiów. Inne wyniki otrzymano w badaniach nad *Osmunda regalis*, gdzie gametofity rosły lepiej na uboższej w składniki mineralne pożywce Knopa (23).

Na podstawie badań własnych i doniesień literaturowych można stwierdzić, że warunki żywieniowe, tak jak inne czynniki fizyczne i chemiczne, wpływają na przebieg rozmnażania się gametofitów, a w konsekwencji na powstawanie sporofitów. W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że przedrośla paproci serpentynitowych rosną tak samo dobrze na pożywce zmodyfikowanej MSZ o składzie makroelementów przypominającym skład podłoża serpentynitowego, jak i na pożywce MS w rozcieńczeniu soli do 1/2. Słabsze namnażanie przedrośli na pożywce z pełnym stężeniem makroelementów wskazuje, że w warunkach naturalnych podłoże bogate

w składniki pokarmowe może ograniczać ich rozwój, a zatem i ekspansję. Dlatego prawdopodobnie paprocie te rosną na serpentynitach, które charakteryzuje nieurodzajność, a nawet toksyczność, gdzie inne gatunki roślin nie mogłyby rosnąć. Tłumaczyć to można w ten sposób, że paprocie serpentynitowe posiadają prawdopodobnie cechy przystosowawcze, które pozwalają im na wzrost w tak niekorzystnych dla ich rozwoju warunkach, jakie istnieją na podłożu serpentynitowym.

5. Podsumowanie

Wysiew zarodników w warunkach *in vitro* umożliwił odtworzenie całego cyklu rozwojowego paproci serpentynitowych, począwszy od gametofitów do sporofitów. Kultury *in vitro* *Asplenium adulterinum* Milde, *A. cuneifolium* Viv., *A. septentrionale* (L.) Hoffm. i *Polypodium vulgare* L. okazały się też skuteczną metodą ich rozmnażania generatywnego i wegetatywnego. W przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że paprocie te wymagają średnio zasobnych gleb, a niedostatek i nadmiar składników odżywczych w podłożu ogranicza tempo ich wzrostu. Podjęte działania w zakresie rozmnażania paproci serpentynitowych zgodne są z nową filozofią pojmowania ochrony przyrody i przyczyniają się do zachowania w naszej florze tych cennych gatunków.

Literatura

1. Zenkteler E., *Systemy wegetatywnego rozmnażania paproci in vivo oraz in vitro*, (2000), Wyd. Nauk UAM, Poznań.
2. Zarzycki K., Kazimierczakowa R., (1993), *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*, PAN, Inst. Bot. Im. W. Szafera i Inst. Ochrony Przyrody, Kraków.
3. Świerkosz K., (1992), *Chron. Przyr. Ojcz.*, 48(1), 96-100.
4. Fabiszewski J., (1993), *Annales Silesiae*, vol. XXIII.
5. Żołnierz L., (1993), *Annales Silesiae*, vol. XXIII.
6. Zarzycki K., Kazimierczakowa R., (2001), *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*, PAN, Inst. Bot. Im. W. Szafera i Inst. Ochrony Przyrody, Kraków.
7. Karpowicz W., (1963), *Fragm. Flor. Et Geobot.*, 9(1), 35-58.
8. Bolewski A., Parachoniak W., (1982), *Petrografia*, PWN, Warszawa.
9. Braun – Blanquet J., (1951), *Pflanzensoziologie*, 2 Aufl. Wien.
10. Holderegger R., (1994a), *Zur Farnflora des Pfannenstils*, Kt. Zurich. *Farnbl.*, 25, 3-21.
11. Zarzycki K., Szczęg Z., (1992), w: red. Zarzycki K., Wojewoda W., Heinrich Z., *Lista roślin zagrożonych w Polsce*, wyd. 2, Inst. Botaniki PAN, Kraków.
12. Cousens M. I., Kelly E. M., Coffman W., (1989), *Am. J. Bot.*, 76, 202.
13. Marszał J., Kromer K., Nowak T. J., (1999), *Prace Ogródu Botanicznego UW*, 5, 1, 415-422.
14. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
15. Raghavan V., (1989), *Developmental biology of fern gametophytes*, Cambridge University Press.
16. Zenkteler E., (1992), *Hod. Rośl. Nasien.*, 5, 20-30.
17. Fernandez H., Bertrand A., Sanchez-Tames R., (1993), *Scientia Hort.*, 56, 71-77.
18. Fernandez H., Bertrand A., Sanchez-Tames R., (1996), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 261-265.

19. Fernandez H., Bertrand A., Feito I., Schez-Tames R., (1997a), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50, 71-74.
20. Knop W., (1865), *Landwirtsch Vers. Stn.*, 7, 93-107.
21. Knudson L., (1946), *Bull. Am. Orchid. Soc.*, 15, 214-217.
22. Klekowski E. J. Jr, (1969), *Bot. J. Linn. Soc.*, 62, 361-377.
23. Fernandez H., Bertrand A., Schez-Tames R., (1997b), *Plant Cell Reports*, 16, 358-362.