

ZASTOSOWANIE KULTUR *IN VITRO* W OCHRONIE RZADKICH I GINĄCYCH GATUNKÓW PAPROCI SERPENTYNITOWYCH

The use of *in vitro* culture methods for the protection of rare and endangered serpentine fern species

Jowita MARSZAŁ, Krystyna KROMER

Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, Sienkiewicza 23, 50-335 Wrocław, Polska

WSTĘP

Największe masywy serpentynitowe w Europie występują na Półwyspie Bałkańskim, w Alpach, południowo-wschodniej Portugalii i w Wielkiej Brytanii (Roberts i Proctor, 1992). 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 Kielczyzna, w Masywie Ślęży (Sobótka i Góra Radunia), na południe od Ząbkowic Śląskich oraz na północny wschód od Kłodzka.

Na serpentynitach można znaleźć ciekawe i rzadkie gatunki roślin. Wśród nich występują pewne gatunki paproci z rodzaju *Asplenium*, których zasięg występowania w Polsce ograniczony jest tylko do podłoża serpentynitowego (Bolewski i Parachoniak, 1982). Do paproci tych, nazywanych paprociami serpentynitowymi, zalicza się zanokcicę klinowatą *Asplenium cuneifolium* Viv., serpentynową *A. adulterinum* Milde, ciemną *A. adiantum-nigrum* 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* (Braun-Blanquet, 1951, Holderegger, 1994). Wszystkie wyżej wymienione gatunki paproci serpentynitowych znajdują się na „czerwonej liście” roślin zagrożonych wymarciem, a jeden z nich *Asplenium adulterinum* został umieszczony w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin (V-narażony) (Zarzycki i Kazimierczakowa, 1993).

Z obserwacji własnych przeprowadzonych w terenie, za główne przyczyny zanikania paproci serpentynitowych uważa się niekorzystne zmiany mikroklimatu, dotyczące przede wszystkim warunków świetlnych i wilgotnościowych. Fabiszewski (1993) i Żołnierz (1993) podają, że przyczyną zanikania paproci serpentynitowych jest ekspansywność innych gatunków (np. trzcinnika leśnego *Calamagrostis arundinacea*) oraz naturalna sukcesja zbiorowisk roślinnych. Ponadto stanowiska, na których rosną paprocie serpentynitowe są atrakcyjne turystycznie i wypoczynkowo, co w krótkim czasie może doprowadzić do zniszczenia populacji, a następnie przyspieszania procesów synantropizacji zbiorowisk roślinnych (Fabiszewski, 1993, Żołnierz, 1993).

Nasilający się proces zagrożenia, a nawet wymieranie paproci serpentynitowych zmusza do przeciwdziałania tym procesom, szczególnie w chwili obecnej, kiedy wiele mówi się o utrzymaniu jak największej bioróżnorodności wszystkich układów ekologicznych. Dlatego konieczne jest przedsięwzięcie działań służących ochronie populacji paproci tworzących jedyny w Polsce przykład zespołu *Asplenietum serpentinii*, którego gatunkami charakterystycznymi są *Asplenium adulterinum* i *Asplenium cuneifolium* (Żołnierz, 1993).

Często na skutek degradacji siedlisk ochrona ekosystemów i biocenoz w warunkach *in situ* jest niemożliwa i dlatego coraz częściej mówi się o ochronie rzadkich i ginących gatunków flory w warunkach *ex situ*, tj. poza ich naturalnymi biotopami (Łukasiewicz, 1985). Metoda *ex situ* polega na prowadzeniu upraw zachowawczych, m.in. na terenie ogrodów botanicznych, a następnie ich reintrodukcji na stanowiska naturalne.

Jedną z metod zachowania *ex situ* zagrożonych gatunków roślin jest technika kultur *in vitro*, która pozwala poznać cykl życiowy i strategię reprodukcyjną badanych roślin.

Badania prowadzone w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego dotyczą dwóch gatunków paproci serpentynitowych *Asplenium adnigrum* i *A. cuneifolium* oraz paproci nie związanych z serpentynitami, ale również na nich występującymi *Asplenium septentrionale* i *Polypodium vulgare*. Dwa ostatnie gatunki paproci nie są zaliczane do roślin ginących w Polsce. Tworzą one jednak izolowane populacje o niskiej liczebności osobników, które wcześniej lub później mogą również zaniknąć (Holderegger i Schneller, 1994, Schneller i Holderegger, 1996). Na przykład w Islandii *Asplenium septentrionale* jest gatunkiem narażonym na wyginięcie (Einarsson, 1988) i dlatego rozpoczęto badania również nad tą paprocią.

MATERIAL I METODY

Materiałem do badań były dojrzałe i żywotne zarodniki 4 gatunków paproci, zebrane ze stanowisk ich naturalnego występowania w 1996 roku. *Asplenium cuneifolium* Książnica i Przemiłów, *A. adnigrum* Książnica, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare* Osola.

Zarodniki dezynfekowano wstępnie w 70% i 96% etanolu w czasie 3, 5, 7 i 10 min, a następnie przez 3, 5 i 10 min w 0.1% podchlorynie sodu oraz przez 1 min w eterze. Zarodniki umieszczano w torebkach z bibuły filtracyjnej zwanych „pakietkami”. Po dezynfekcji zarodniki trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Wydezynfekowane zarodniki wszystkich badanych gatunków paproci wysiewano równomiernie, wraz z niewielką ilością sterylnej wody, na pożywkę Murashige’a i Skooga w rozcieńczeniu do 1/4 (Murashige i Skoog, 1962). Pożywkę zestalono agarem (8 g/dm³), stężenie sacharozy wynosiło 30 g/dm³ a kwasowość pożywki ustalono na poziomie pH 6,2 przed autoklawowaniem (1 Atm, 121°C, 18 min). Zarodniki wysiewano do kolbek o pojemności 100 ml, zawierających po 35 ml pożywki, kultury umieszczano w pokoju hodowlanym

o temperaturze 18–20°C, przy oświetleniu wynoszącym 4,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Do testowania różnego stężenia kinetyny i IAA (0,01; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 i 1,5 mg/dm³) podawanych łącznie lub rozdzielnie, na wytwarzanie organów płciowych (rodni i plemni) wybrano *Asplenium adnigrum* i *A. cuneifolium*.

W następnym doświadczeniu badano wpływ naświetlania pełnym spektrum światła o różnej gęstości strumienia fotonów (4,9; 5,2; 12,2 i 34,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) oraz braku oświetlenia (ciemności) na rozwój organów płciowych (rodni i plemni) *A. adnigrum* i *A. cuneifolium*.

Kolejne badanie dotyczyło ustalenia wpływu obecności wody na wytwarzanie sporofitów *Asplenium adnigrum*, *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare*.

W doświadczeniach używano roztworu odżywczego Murashige’a i Skooga w rozcieńczeniu do 1/2. Pożywkę zestalano agarem (8 g/dm³), a stężenie sacharozy wynosiło 30 g/dm³. Do badań wybrano stadium nitkowate przedrośli *Asplenium adnigrum*, *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare*. Przedrośla umieszczano w kolbkach o pojemności 100 ml, zawierających 35 ml pożywki. Kultury znajdowały się w pokoju hodowlanym o temperaturze 18–20°C.

WYNIKI I DISKUSJA

Założenie kultur *in vitro*. Wybrana została metoda dezynfekcji 70% etanolem w czasie 3 min, a następnie 5 min w 0,1% podchlorynie sodu. Pozostałe sposoby dezynfekcji opóźniały bądź całkowicie hamowały kiełkowanie zarodników paproci. Najwcześniej kiełkowały zarodniki *Polypodium vulgare* i *A. septentrionale*, a najpóźniej zarodniki *Asplenium cuneifolium* i *A. adnigrum*. Gametofit wykształcił się zależnie od gatunku po 3–8 miesiącach, a sporofit pojawił się po 9 miesiącach. Przedrośla podlegały określonej sekwencji przemian, od stadium nitki do łopatki u *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare* oraz od stadium nitki do stadium sercowatego u *Asplenium adnigrum*. Gametangia pojawiały się w stadium sercowatym u *Asplenium adnigrum*, a u pozostałych gatunków we wczesnym stadium łopatki.

Wybrana w powyższej pracy metoda dezynfekcji zarodników dała zadowalające wyniki i nie wykazywała działania toksycznego lub opóźniającego kiełkowanie zarodników. Do wysiewu zarodników i kultur gametofitów i sporofitów zastosowano pożywkę Murashige i Skooga (1962), która była stosowana również przez Fernandez, Bertranda i Sanchez-Tames'a (1993) przy hodowli *in vitro* *Asplenium nidus*. Prawdłowo rozwinięty gametofit pojawiał się po 3–4 miesiącach kolejno u *Polypodium vulgare*, *Asplenium septentrionale*, *A. cuneifolium* i *A. adulterinum*. Po upływie 6 miesięcy od skielkowania zarodników otrzymano pierwsze sporofity *Polypodium vulgare*, i *Asplenium septentrionale*, a po 8 miesiącach *A. adulterinum*, *A. cuneifolium*. Podobne wyniki otrzymali Fernandez, Bertrand i Sanchez-Tames (1993) u przedrośli *Asplenium nidus*, które tworzyły sporofity po upływie 6 miesięcy.

Wpływ regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin na rozwój organów płciowych *Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium* w kulturze *in vitro*. Stwierdzono zróżnicowane działanie niskich stężeń IAA w stosunku do dwóch badanych gatunków paproci. Niskie stężenie IAA wpływa na wytwarzanie się rodni u *A. adulterinum*. Pod wpływem IAA zmienia się też wzajemny stosunek tworzących się rodni do plemni na przedroślach *A. adulterinum*. Począwszy od dawki $0,2 \text{ mg/dm}^3$, aż do dawki $0,8 \text{ mg/dm}^3$ IAA zmniejsza się ilość rodni, a zwiększa się pojawianie plemni na kulturowanych *in vitro* przedroślach *A. adulterinum*. Przy wysokich stężeniach tego hormonu ustaje tworzenie rodni i plemni. Stężeniem działającym hamująco na rozwój organów płciowych dla *A. adulterinum* jest $0,8 \text{ mg/dm}^3$ IAA. Znacznie wrażliwszym gatunkiem na stosowane dawki IAA było *A. cuneifolium*. Niskie stężenie IAA wpływa na wytwarzanie się plemni na przedroślach, ale już przy stężeniu $0,2 \text{ mg/dm}^3$ IAA obserwowano zahamowanie tworzenia organów płciowych u tego gatunku.

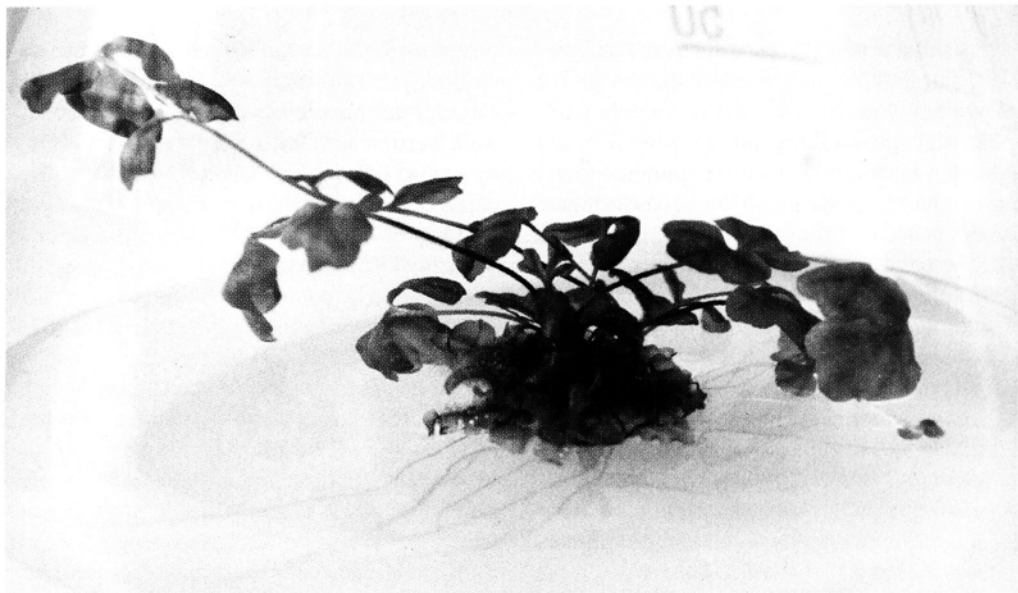
Kinetyna wykazywała zróżnicowane działanie w niskim zakresie stężeń. Niskie stężenia kinetyny wpływały na rozwój rodni i plemni u *A. adulterinum*. Począwszy od stężenia $0,2 \text{ mg/dm}^3$ kinetyny zmniejsza się ilość plemni, a przy naj-

wyższym ze stosowanych stężeń tego hormonu brak jest zarówno rodni jak i plemni. U *A. cuneifolium* niewielkie dawki kinetyny wpływają na rozwój rodni, a wzrost stężenia kinetyny już od $0,2 \text{ mg/dm}^3$ jest niekorzystny, gdyż działa hamująco na rozwój organów płciowych.

Oba regulatory wzrostu dodane jednocześnie do pożywki działały stymulująco na rozwój rodni i plemni u *A. adulterinum*. Bardziej wrażliwe na stosowane hormony z grupy auksyn i cytokinin okazało się *A. cuneifolium*. Korzystny wpływ na rozwój organów płciowych u tego gatunku wywierały tylko najniższe stężenia IAA i kinetyny ($0,01$; $0,1$ i $0,2 \text{ mg/dm}^3$).

Miller (1968) rozpoczął badania nad gametofitami paproci, które miały na celu przyspieszanie rozwoju gametangiów i zwiększanie liczby sporofitów otrzymywanych z jednego gametofitu. Efekty te osiągnęto przez traktowanie przedrośli regulatorami wzrostu (Kato, 1967; Von Anderkas, 1986; Cheema i Sharma, 1991). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że IAA wpływa na wykształcanie plemni u obu badanych gatunków, natomiast kinetyna działa stymulująco na rozwój rodni, ale tylko u *A. cuneifolium*. Stosowane regulatory wzrostu IAA i kinetyna stymulują tworzenie organów płciowych w przedroślach badanych gatunków paproci aż do stężenia, powyżej którego ich powstawanie zostaje zahamowane. Stężenie to jest inne dla *Asplenium adulterinum* ($0,8 \text{ mg/dm}^3$) i inne dla *A. cuneifolium* ($0,2 \text{ mg/dm}^3$). Zaobserwowano, że przedrośla *A. adulterinum* łatwiej wytwarzają rodnie i plemn timer niż gametofity *A. cuneifolium*, co wyjaśniałoby dłuższy okres potrzebny do wykształcenia sporofitu tej ostatniej paproci.

Wpływ intensywności światła na rozwój organów płciowych (rodni i plemni) *Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium*. Analiza mikroskopowa przedrośli przeprowadzona po 21 dniach od daty założenia doświadczenia pozwoliła stwierdzić, że ciemność nie wpływa hamująco na wytwarzanie rodni i plemni. Przy najwyższym ze stosowanych natężeniu strumienia kwantów ($34,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), przedrośla nie wytwarzały organów płciowych u obu badanych gatunków paproci. Największą ilość rodni i plemni można było zaobserwować na przed-



Fot. 1. Zanokeica serpentynowa (*Asplenium adulterinum* Milde)

Fig. 1. *Asplenium adulterinum* Milde

roślach rosnących przy oświetleniu wynoszącym 5,2 i 12,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po dalszych 3 tygodniach naświetlania kultur światłem o różnym natężeniu strumienia kwantów nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w morfologii przedrośli. Jedynie gametofity rosnące w ciemności były małe, jasnozielone i wytwarzały dużą ilość chwytników. Chwytniki, zdaniem Zenkteler (1992) prawdopodobnie pełnią one funkcje ochronne przed niekorzystnymi dla ich rozwoju warunkami.

Stwierdzono, że w początkowym okresie wzrostu i rozwoju przedrośla nie wymagają intensywnego oświetlenia, które jest dla nich wręcz niekorzystne. Światło o wysokiej intensywności powoduje zahamowanie wytwarzania rodni i plemni. W przeprowadzonych doświadczeniach nie obserwowano opóźnienia rozwoju gametofitu i zaburzeń w gametogenezie powodowanych przez niedobór światła opisywanych przez Pietrykowską (1962) i Karpowicz (1972). Stosowane w doświadczeniach krótkotrwałe okresy niedoboru światła nie wpływały ujemnie na rozwój gametangiów u badanych gatunków paproci.

Rozwój sporofitów *Asplenium adulterinum*, *A. cuneifolium*, *A. septentrionale* i *Polypodium vulgare*. Stwierdzono, że sporofity nie pojawiały się na pożywce agarowej. Natomiast na pożywce agarowej z dodatkiem wody wytwarzały się sporofity kolejno po 30 dniach u *A. adulterinum* (fot. 1), po 40 dniach u *A. septentrionale*, po 45 dniach u *Polypodium vulgare* i najpóźniej po 60 dniach u *A. cuneifolium*. Dla wszystkich badanych gatunków paproci niezbędna jest obecność wody aby doszło do procesu zapłodnienia, a przy niedostatku wilgoci sporofity nie są wytwarzane.

Zenkteler (1992; 2000) wykazała, że metoda *in vitro* może być stosowana przy rozmnażaniu za pomocą zarodników (*Asplenium adiantum-nigrum*, *Cryptogramma crista*, *Osmunda regalis* i inn.) oraz kłęcz (Osmunda regalis, Botrychium lunaria, Phegopteris connectilis, Athyrium distentifolium i inn.) gatunków paproci chronionych i zagrożonych wyginięciem. Przeprowadzone w powyższej pracy doświadczenia pozwalają wzbogacić listę paproci rozmnażanych z powodzeniem w warunkach kul-

tury *in vitro* o cenne paprocie serpentynitowe *Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium*.

WNIOSKI

1. Opracowano skuteczną metodę dezynfekcji zarodników badanych gatunków paproci 70% etanolem w czasie 3min, a następnie 5min w 0,1% podchlorynie sodu.
2. Przedrośla *Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium* charakteryzuje duża, specyficzna dla każdego gatunku wrażliwość na stosowane egzogenne hormony. Niskie stężenia IAA i kinetyny stymulują powstawanie organów płciowych zaś wyższe hamują ich różnicowanie.
3. Stwierdzono, że IAA wpływa na wykształcanie plemni u obu badanych gatunków, natomiast kinetyna stymuluje wykształcanie rodni, ale tylko u *A. cuneifolium*.
4. Liczba powstających gametangiów silnie zależy od warunków świetlnych. Niskie intensywności światła sprzyjają powstawaniu rodni i plemni zaś naświetlenie światłem o gęstości strumienia kwantów równej bądź wyższej niż $34,3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ powoduje hamowanie wytwarzania gametangiów. Krótkotrwały okres niedoboru światła nie wpływa ujemnie na rozwój organów płciowych u badanych gatunków paproci.
5. Potwierdzono konieczność wysokiej wilgotności powietrza w kolbach uzyskiwanej dzięki dodatkowi wody, w procesie zapłodnienia i powstawania sporofitu.
6. Wykazano przydatność metody kultur *in vitro* w rozmnażaniu rzadkich i ginących gatunków paproci serpentynitowych.

SUMMARY

Asplenium adulterinum Milde, *A. cuneifolium* Viv., *A. adiantum-nigrum* and *A. onopteris* var. *silesiaca* Milde recorded in Poland exclusively in Dolny Śląsk Region. This rare and endangered species grow in crevices of poorly lime and molybdenum-yielding, high chromium, magnezium, cobalt and nickel serpentinite rocks and scree. The sites normally receive considerable direct sunshine. This evergreen ferns grow exclusively in a restricted serpenti-

ne area and therefore the distribution of the populations is patchy and the populations are isolated from other plants. Conservation biology usually deals with rare or endangered species, but it should also deals species becoming endangered soon or having a heavily fragmented distribution range. The isolated populations may disappear sooner or later because renewal may no longer be possible. In order to protect these populations it would be very important to preclude any change of habitat and removal of individuals. The invironmental conditions permitting the presence of the species have to be maintained. It is also possible to use of *in vitro* method for the propagation of rare and endangered plant species and it becomes a major technique for their protection. *In vitro* method gives possibility to consider the special characteristics of life cycle and breeding system of fern species. Our discussion about usefulness of *in vitro* culture methods for the propagation of small and separated rare and threatened fern species is considered to be important in the context of consevation biology.

LITERATURA

- Bolewski A. Parachoniak W., 1982. Petrografia, PWN, Warszawa.
- Braun-Blanquet J., 1951. Pflanzensozjologie, 2 Aufl. Wien.
- Cheema K.H., i Sharma M.B., 1991. In vitro induction and differentiation of gametophyte callus in *Ceratopteris thalictroides*. Indian Fern J. 8:74-78.
- Einarsson E., 1988. Endangered, vulnerable and rare species of vascular plant in Iceland. Sven. Bot. Tidskr., vol. 82(6):389-391.
- Fabiszewski J., 1993. Problemy ochrony szaty roślinnej w obszarze wzgórz Śląży. Annales Silesiae, vol. XXIII:65-76.
- Farnandez H., Bertrand A., Sanchez-Tames R., 1993. In vitro regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. Scientia Horticulturae, 56:71-77.
- Holderegger R., 1994. Zur Farnflora des Pfannenstils, Kt. Zurich. Farnbl. 25:3-21.
- Holderegger R., Schneller F.L. S., 1994. Are small isolated populations of *Asplenium septentrionale* variable? Biol. Journal of the Linnean Society, 51:377-385.
- Karpowicz W., 1972. Paprocie, Warszawa PWN:167.

- Kato Y.**, 1967. Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes and sporophytes in aseptic culture. VIII. Behaviour of *Pteris vittata* gametophytes on sugar and complex media in red light. *Planta* 77:127-134.
- Lukasiewicz A.**, 1985. Rola ogrodów botanicznych i arboretów w ochronie gatunków rzadkich i ginących. *Wiad. Bot.*, 29(2):137-151.
- Miller J. H.**, 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* 34:361-440.
- Murashige T., Skoog A.**, 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 13: 473-497.
- Pietrykowska J.**, 1962. Investigation on the germination of spores of the fern *Matteuccia struthiopteris*. (L.) Tod., *Acta Soc. Bot. Pol.* 31, 3:437-447.
- Pietrykowska J.**, 1962. Investigation on the differentiation of development stages of the fern *Matteuccia struthiopteris*. (L.) Tod., *Acta Soc. Bot. Pol.* 31, 3:449-459.
- Roberts B. A., Proctor J.**, 1992. The ecology of areas with serpentinized rocks. A word view. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 427.
- Schneller J. J., Holderegger R.**, 1996. Genetic variation in small, isolated fern populations. *J. Veg. Scie.* 7:113-120.
- Von Anderkas P.**, 1986. Enhancement of apospory in liquid culture of *Matteuccia struthiopteris*. *Ann. Bot.* 57:505-510.
- Zarzycki K., Kazimierczakowa R.**, 1993. Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i Rośliny Kwiatowe. PAN, Inst. Bot. Im. W. Szafera i Inst. Ochrony Przyrody, Kraków, 305s.
- Zenktele E.**, 1992. Metoda *in vitro* w rozmnażaniu i okresowym przechowywaniu chronionych oraz rzadkich i ginących gatunków paproci. *Hod. Rośl. Nasien.*, 5:20-30.
- Zenktele E.**, 2000. Systemy wegetatywnego rozmnażania paproci *in vivo* oraz *in vitro*. Wydawnictwo Naukowe UAM.
- Żolnierz L.**, 1993. Paprocie serpentynitowe w Maświe Ślęży. *Annales Silesiac* vol. XXIII:77-91.