

ROZMNAŻANIE *IN VITRO* POPULACJI *DROSERA INTERMEDIA* POCHODZĄCYCH Z GÓR IZERSKICH

In vitro propagation of the populations of *Drosera intermedia* from Izerskie Mountains

Krystyna KROMER¹, Tomasz NOWAK¹, Bronisław WOJTUN², Dorota POTURAŁA¹

¹Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Sienkiewicza 23, 50-335 Wrocław

²Akademia Rolnicza we Wrocławiu, Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin,
ul. Cybulskiego 32, 50-205 Wrocław

WSTĘP

W Polsce występują 3 gatunki z rodzaju *Drosera*: *D. rotundifolia* (rosiczka okrągłolistna), *Drosera anglica* (rosiczka długolistna) i *D. intermedia* (rosiczka pośrednia), głównie na niżu, rzadziej w górach. Najczęściej preferują kwaśne i oligotroficzne siedliska torfowisk wysokich i przejściowych, lecz *D. anglica* toleruje też bardziej zasadowe podłoże i spotykana jest w fitocenozach eutroficznych młak ze związku *Caricion davallianae*.

Wszystkie występujące w Polsce gatunki rosiczek podlegają prawnej ochronie. W ostatnim czasie liczba stanowisk rosiczek, a szczególnie *D. anglica* i *D. intermedia*, zmniejsza się w szybkim tempie, głównie ze względu na zanik ich siedlisk, chociaż równie istotne mogą być też inne czynniki. Między innymi, zmniejszenie liczby osobników w populacjach, a także oddalenie poszczególnych stanowisk tych roślin może ograniczać możliwości krzyżowania między osobnikami, a tym samym doprowadzać do zubożenia ich puli genowej. Wykluczyć nie można też wpływu niekorzystnych warunków klimatycznych i edaficznych.

Wymieraniu rzadkich roślin nie zapobiega ani całkowita ochrona gatunkowa, ani objęcie ochroną rezerwatową ich naturalnych siedlisk (Medwecka-Kornaś, 1971; Michalik, 1972). Dlatego też, w ostatnich latach podkreśla się rolę ogrodów botanicznych w zachowaniu rzadkich i ginących roślin w warunkach *ex situ*. Polegać ma ona na prowadzeniu upraw zachowawczych *ex situ*, a następnie reintrodukcji takich populacji na stanowiska naturalne. Ogrom-

ne możliwości w realizacji tego zadania stwarza technika rozmnażania roślin w warunkach *in vitro*, która umożliwia nie tylko szybkie zwiększenie liczby osobników poszczególnych populacji, ale pozwala też na długoterminowe przechowywanie ich plazmy zarodkowej w banku genów. Ustalenie wymagań pokarmowych utrzymywanych *in vitro* roślin i optymalnych dla ich wzrostu warunków powinno przyczynić się do określenia czynników zasadniczych dla wzrostu i rozwoju poszczególnych gatunków ginących. Dalsze wieloletnie i uważne obserwacje terenowe istniejących, bądź reintrodukowanych populacji roślin zagrożonych pozwolą na ustalenie przyczyn ich zanikania w danym siedlisku i doprowadzą do podjęcia właściwych działań. Naszym zdaniem dopiero takie pojmowanie ochrony gatunków ginących i zagrożonych da oczekiwane rezultaty.

W Sudetach *Drosera intermedia* Hayne występuje na torfowiskach Topieliska w Górach Bystrzyckich oraz doliny Izery w Górach Izerskich. W Górach Izerskich gatunek ten był podawany przez Schubego (1903) z wielu torfowisk w rejonie Izerskiej Hali, lecz od tego czasu nie był potwierdzony. W 1997 r. odnaleziono nowe stanowisko, które obecnie jest jedynym w Górach Izerskich (Matuła i in., 1998). Populacja jest silnie zagrożona z powodu trawienia przez dziką zwierzynę i w przyszłości może dojść do zniszczenia tego stanowiska. Było to powodem podjęcia badań nad rozmnażaniem *in vitro* tej unikatowej populacji.

Od roku 1984 w Pracowni Kultur Tkankowych Ogrodu Botanicznego prowadzi się kulturę różnych gatunków rosiczek (Kukulczanka i Czastka, 1987a, 1987b; Kukulczanka, 1991; Kukulczanka i in., 1991). Wśród występujących u nas rosiczek *Drosera rotundifolia* charakteryzuje się wysokim współczynnikiem rozmnażania wegetatywnego, natomiast wolniejsze tempo rozmnażania obserwowano u *D. anglica*, a najsłabsze u *D. intermedia*.

Celem pracy było opracowanie metody rozmnażania i przygotowanie do reintrodukcji populacji *Drosera intermedia* pochodzącej z Gór Izerskich.

MATERIAŁ I METODY

Dezynfekcja nasion. Nasiona *D. intermedia* zebrane w roku 1998 i 1999 na Bagnie Borowina w Górach Izerskich wysiano w warunkach *in vitro* na pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1964) o zredukowanym do 1/4 stężeniu makroelementów. Dezynfekcję prowadzono kilkoma roztworami podchlorynu sodu przez okres od 5 do 8 min. Najskuteczniejsza była dezynfekcja 1% roztworem podchlorynu przez 12 min.

Wzrost siewek i sposób prowadzenia kultury roślin. Wzrost siewek w standardowych warunkach kultury w początkowym okresie był bardzo wolny, wobec czego część materiału roślinnego przeniesiono do chłodni (temperatura 4-8°C) na okres 3, 6 i 12 miesięcy. Zastosowano także różne warunki świetlne dla kiełkujących *in vitro* siewek, a mianowicie natężenia strumienia światła równe 11,3, 34,4 i 66,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Określono wpływ stężenia makroelementów w pożywce agarowej Murashige i Skooga (1969) na wielkość rozet, współczynnik rozmnażania i rozwój systemu korzeniowego. W doświadczeniach stosowano także pożywkę (MSLS) opracowaną specjalnie dla roślin owadożernych w Libercu (Studnička, 1984). Badano wpływ wybranych auksyn i cytokinin na wzrost roślin i regenerację izolowanych liści. W celu indukcji obfitszego systemu korzeniowego do pożywki dodawano niewielkie dawki (0,1 mg/L) auksyny IBA.

Przygotowywanie roślin do przeniesienia w warunki szklarniowe. Zwiększenie odporności na stres wilgotnościowy, związany z przenoszeniem roślin do szklarni, osiągnąć można prowadząc kultury rosiczek na pożywce płynnej z perlitem jako podporą, co umożliwia regulację wilgotności w kolbach. Stosowano 15, 20 i 30 ml pożywki płynnej zawierającej 1/2 stężenia makroelementów na 50 ml objętości powietrza suchego perlitu. Rośliny pochodzące z kultur wysadzano do doniczek w podłoża składające się wyłącznie z torfu lub mieszaniny torfu z perlitem, torfu z ziemią dla paproci, torfu z piaskiem lub do akwarium zawierającego warstwę perlitu, warstwę torfu i rosnący mech torfowiec.

WYNIKI I DISKUSJA

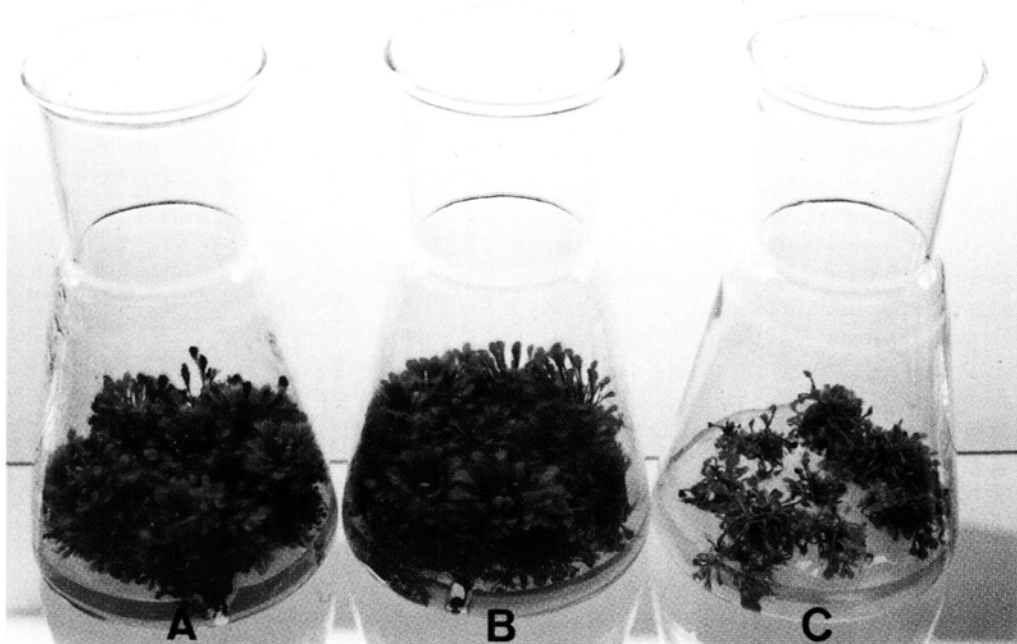
Nasiona *D. intermedia* zebrane na Bagnie Borowina w Górach Izerskich w roku 1998 wschodziły bardzo słabo (5%), natomiast nasiona zebrane w roku 1999 dezynfekowane tą samą metodą i wysiewane na taką samą pożywkę kiełkowały w znacznie wyższym procencie. Pierwsze wschody pojawiały się już po upływie tygodnia od momentu wysiania. Kiełkowanie było nierównomierne i zachodziło w czasie 2-5 miesięcy. Ogółem kiełkowało około 60% wysianych nasion. Rozwój siewek w warunkach kultury w początkowym okresie był bardzo wolny. Zastosowanie różnych warunków świetlnych wykazało, że zwiększenie natężenia strumienia światła do 66,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ znacznie przyspiesza ich wzrost.

Przebadano kilka pożywek, a mianowicie pożywkę Murashige i Skooga (1962) stosowaną w różnym rozcieńczeniu (1/4, 1/2, 1) oraz pożywkę MSLS (Studnička, 1984). Najlepszy wzrost i namnażanie wykazywały rośliny prowadzone na pożywce MS zawierającej 1/2 stężenia makroelementów (tab. 1). Rośliny hodowane na tej pożywce w stosunku do pożywki pełnej i ze zredukowanym do 1/4 poziomem makroelementów charakteryzowały się najwyższą liczbą rozwijających się rozet bocznych (3,0) oraz największą liczbą powstających na liściach rozet przybyszowych (23,5). Tworzyły one też największe rozety, a ich sucha masa była najwyższa. Na pożywce z 1/2 MS obser-

wowano nieco mniejszą liczbę korzeni niż na pożywce o zredukowanej do 1/4 zawartości makroelementów, co związane jest z hamującym ukorzenianie wpływem intensywnego odżywiania mineralnego. Korzenie wykształcone na pożywce zawierającej 1/2 stężenia makroelementów były dwukrotnie dłuższe niż na pożywce o obniżonym do 1/4 stężeniu soli. Rośliny rosnące na pożywce zawierającej 1/4 stężenia makroelementów po 5 miesiącach kultury zaczynały wykazywać oznaki niedoboru składników mineralnych, co objawiało się żółknięciem najstarszych liści. Pełna pożywka MS była zbyt bogata dla tego gatunku. Wysokie stężenie soli powodowało epinastę liści i znaczne osłabienie wzrostu roślin, zmniejszenie współczynnika rozmnażania i słaby rozwój korzeni (tab. 1, fot. 1). Przedstawiona analiza przebiegu procesów wzrostu na podłożach o różnej zawartości makroskładników rzuca pewne światło na wymagania pokarmowe *Drosera intermedia*, które wbrew utartym opiniom nie

są takie małe, jak się powszechnie sądzi. Prawdopodobnie można by tu postawić tezę, że jedną z przyczyn zanikania tej rośliny w naturze jest niedobór makroelementów na stanowiskach naturalnych.

W przeciwieństwie do wyników Królickiej i in. (1998) stwierdzono, że rosiczka pośrednia wykazuje ogromną wrażliwość na egzogenne podawane regulatory wzrostu. Auksyna i cytokinina stosowane w niskich stężeniach zwiększały nieco liczbę rozet rozwijających się z pąków kątowych w bazalnej części pędu, lecz powodowały jednocześnie nekrozy wierzchołków wzrostu. Dodatek niewielkiej ilości auksyny IBA (0,1 mg/l) promował wzrost średnicy rozetek i nieznacznie poprawiał rozwój korzeni. Zarówno auksyny jak i cytokiny stosowane w wyższych dawkach (0,25–1,0 mg/L) powodowały pojawianie się anomalii rozwojowych a następnie nekroz. Na działanie hormonów silniej reagowały izolowane fragmenty roślin niż całe rozety. Zjawisko to obserwowa-



Fot. 1. Rośliny *Drosera intermedia* na pożywce MS zawierającej różne dawki makroelementów: A - 1/4; B - 1/2; C - 1/1 po 5 miesiącach kultury

Fot. 1. Plants of *Drosera intermedia* on MS medium containing various doses of macronutrients: A - 1/4; B - 1/2; C - 1/1, after 5 months of culture

Tab. 1. Wzrost, rozmnażanie i ukorzenianie *Drosera intermedia* na pożywce agarowej MS z różną zawartością makroelementów po 5 miesiącach kultury
 Tab. 1. Growth, multiplication and rooting of *Drosera intermedia* on MS agar medium with various doses of macronutrients, after 5 months of culture

Zawartość makroelementów w pożywce Content of macronutrients in medium	Rosliny rozwijające paki katowe Plants developing axillary shoots[%]	Średnia liczba rozet bocznych Mean no. of axillary rosettes	Rosliny tworzące rozety przybyszowe Plants forming adventitious rosettes [%]	Średnia liczba rozet przybyszowych Mean no. of adventitious rosettes	Średnia wielkość rozety Mean diameter of rosette [mm]	Ukorzenianie Rooting [%]	Średnia liczba korzeni Mean no. of roots	Średnia długość korzeni Mean length of roots[mm]	Sucha masa roślin* Dry weight of plants* [g]
1/4	100	2,5 (0,5)	100	17,0 (2,0)	37,0 (2,6)	100	8,3 (0,9)	12,0 (0,6)	0,860
1/2	100	3,0 (0,5)	100	23,5 (2,0)	39,5 (1,6)	100	7,3 (1,3)	22,5 (2,3)	0,910
1	62,5	1,8 (0,7)	100	8,3 (2,6)	24,5 (1,2)	100	3,9 (0,8)	7,3 (0,5)	0,545

(...) – błąd standardowy (standard error)

Tab. 2. Wzrost, rozmnażanie i ukorzenianie *Drosera intermedia* na pożywce płynnej 1/2 MS z perlitem jako podpora po 5 miesiącach kultury
 Tab. 2. Growth, multiplication and rooting of *Drosera intermedia* on 1/2 MS liquid medium with perlite as a support, after 5 months of culture

Zawartość makroelementów w pożywce Content of macronutrients in medium	Rosliny rozwijające paki katowe Plants developing axillary shoots[%]	Średnia liczba rozet bocznych Mean no. of axillary rosettes	Rosliny tworzące rozety przybyszowe Plants forming adventitious rosettes [%]	Średnia liczba rozet przybyszowych Mean no. of adventitious rosettes	Średnia wielkość rozety Mean diameter of rosette [mm]	Ukorzenianie Rooting [%]	Średnia liczba korzeni Mean no. of roots	Średnia długość korzeni Mean length of roots[mm]	Sucha masa roślin* Dry weight of plants* [g]
15	0	0	57,1	1,75 (0,7)	23,4 (0,8)	100	3,3 (0,2)	8,6 (0,6)	0,110
20	12,5	2,0 (0,2)	62,5	3,2 (0,4)	30,2 (1,1)	100	3,3 (0,4)	11,6 (1,0)	0,155
30	62,5	2,4 (0,7)	100	10,9 (1,1)	20,1 (1,5)	100	5,8 (1,1)	28,9 (4,3)	0,490

(...) – błąd standardowy (standard error)

ła również Kukułczanka i Czastka (1987a, 1987b) u kilku gatunków rosziczek, dlatego proponowana przez nią pożywka – RM dla roślin owadożernych nie zawiera hormonów roślinnych, a jej zasobność w składniki mineralne można zaliczyć do średnich.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w kulturze *in vitro* rosziczki pośredniej należy unikać dodatku hormonów, a intensywność wzrostu i rozmnażania wegetatywnego regulować stężeniem makroelementów w pożywce i natężeniem oświetlenia.

Kolejnym bardzo ważnym zabiegiem związanym z reintrodukcją gatunków ginących jest opracowanie właściwej metody hartowania roślin przed ich przeniesieniem *ex vitro* i techniki aklimatyzacji w szklarni. Stosowanie pożywki płynnej z perlitem jako podporą, w stosunku do pożywki agarowej ograniczyło wzrost rozet i rozwój pąków pachwinowych (tab. 2). Zmniejszeniu ulegała również liczba regenerujących na liściach pąków przybyszowych, szczególnie przy małym wysyceniu perlitu pożywką płynną. Rośliny hodowane na pożywce płynnej z perlitem jako podporą, w stosunku do roślin prowadzonych na pożywce agarowej posiadały znacznie lepiej wykształcony system korzeniowy, a zawartość wody w ich tkankach była niższa, co sprzyjać powinno aklimatyzacji. Jednak jak się później okazało największym problemem związanym ze wzrostem roślin w szklarni nie było ich wysychanie po przeniesieniu *ex vitro*, lecz infekcje grzybowe pojawiające się na liściach rosziczek wysadzonych w podłoża, których głównym składnikiem był torf. Rozwój pleśni zredukowano wysadzając rośliny do akwarium, w którym wcześniej hodowano mech torfowiec. Obserwacje te potwierdzają fungitoksyczne właściwości *Sphagnum*.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że posługując się metodą kultur *in vitro* można z wysianych nasion uzyskać w ciągu 18 miesięcy ponad 2600 roślin. Metoda ta przyczyniła się do poznania optymalnego dla *Drosera intermedia* odżywiania mineralnego. Okazało się, że podnoszenie zasobności pożywki do pew-

nej granicy, którą jest 1/2MS decyduje o tempie wzrostu i współczynniku rozmnażania rosziczki pośredniej. Dalsze podwyższenie stężenia makroelementów (pełne MS) było już toksyczne. Wykazano również, że dobry wzrost rosziczki pośredniej warunkowany jest dużym natężeniem światła ($66,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Aklimatyzowane w szklarni rośliny najlepiej znoszą wysadzanie do akwarium zawierającego kolejno począwszy od podstawy warstwę perlitu, torfu i dobrze rosnącego *Sphagnum*.

Obserwacje kultur *in vitro* *Drosera intermedia* wskazują, że przy reintrodukcji na stanowiska naturalne należy zwrócić szczególną uwagę na dwa czynniki decydujące o intensywnym wzroście tych roślin, a mianowicie: dobre nasłonecznienie wybranych do reintrodukcji stanowisk i odpowiednią zasobność siedliska w składniki mineralne.

SUMMARY

The number of the localities of *Drosera intermedia* is decreasing during the last years very quickly, mainly because of the degradation of their habitats, however, equally important can be not fully known other factors. The scope of the study was to multiply *in vitro* the population of *Drosera intermedia* from the Izerskie Mountains and prepare plants for reintroduction. During 18 months we obtained in the tissue culture condition more than 2600 plants from a portion of seeds collected on the Borowina Bog. It was found that *D. intermedia* required a not quite low mineral nutrition, however a full concentration of MS medium was toxic. From dilution of MS medium (1/4; 1/2; 1/1 of macronutrients) used during the experiment the best growth, rooting and propagation was obtained on 1/2MS. *D. intermedia* needs rather high irradiation ($66,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for growth. Hardening of *in vitro* plants prior to transfer to the greenhouse was carried out on a liquid medium with perlite as a support. Plants growing on such a medium rooted better than on agar medium, their leaves were more resistant to desiccation, but growth and propagation was slowed down. The real problem during *ex vitro* growth of plants was not desiccation, but fungus infections appearing on

leaves. The best growth of plants in the greenhouse was observed when plants were transferred to an aquarium with a layer of perlite or sand, a layer of peat and a layer of growing *Sphagnum*.

The study indicates that during the reintroduction of *D. intermedia* to natural habitats special attention should be given to two factors important for its growth, e.g. good insolation of locality and appropriate richness of habitat in macronutrients.

LITERATURA

- Królicka A., Wachnik J., Waleron K., Łojkowska E., 1998. Optymalizacja warunków prowadzenia kultur *in vitro* roślin owadożernych. Mat. Sympozjum i Obrad Sekcji - 51 Zjazdu PTB, Gdańsk, 1998, 247
- Kukulczanka K., 1991: Micropropagation and *in vitro* germplasm storage of *Droseraceae*. Bot. Gardens Micropropagation News 1, 38-42.
- Kukulczanka K., Czastka B., 1987a: *In vitro* cultures of *Drosera* sp. Acta Hort. 226, 631-634.
- Kukulczanka K., Czastka B., 1987b: Rozmnażanie rośliczek w warunkach *in vitro*. Wiad. Bot. 32(2), 61-64.
- Kukulczanka K., Kromer K., Klonowska B., Czastka B., 1991: Wpływ temperatury na przechowywanie roślin *Droseraceae in vitro*. Prace Ogrodu Bot. PAN, Zeszyt 1, 63-68
- Murashige T., Skoog F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497
- Matuła J., Wojtuń B., Żolnierz L., Tomaszewska K., 1998. Ginące i rzadkie gatunki roślin torfowiskowych Sudetów oraz konieczność ich ochrony. Mskr. Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin Akademii Rolniczej, Wrocław, 25-26
- Medwecka-Kornaś A., 1971. Ekologia a ochrona przyrody. Wiadom. Ekol. 17, 14,337-352
- Michalik S., 1972. Synantropizacja szaty roślinnej na terenach chronionych w świetle nowych poglądów na rezerwatową ochronę przyrody. Wszechświat, 7/8, 181-186
- Schube T., 1903. Die Verbreitung der Gefäßpflanzen in Schlesien preussischen und österreichischen Antelis, Breslau.
- Studnička M., 1984. Msožravé Rostliny. Československá Akademie Věd, Praha, 133-134

Badania prowadzono w ramach projektu badawczego nr 363/89/IV/98 współfinansowanego przez Fundację EkoFundusz.