

## OCHRONA *EX SITU* ZAGROŻONYCH GATUNKÓW PAPROCI Z RODZAJU *ASPLENIUM* PRZY WYKORZYSTANIU KULTUR *IN VITRO*

### *Ex situ* protection of endangered *Asplenium* ferns species using *in vitro* culture

Jowita MARSZAŁ-JAGACKA<sup>1</sup>, Krystyna KROMER<sup>1</sup>, Krzysztof ŚWIERKOSZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, Pracownia Kultur Tkankowych,  
ul. Sienkiewicza 23, 50-335 Wrocław;

<sup>2</sup>Muzeum Przyrodnicze Uniwersytetu Wrocławskiego ul. Sienkiewicza 21, 50-355 Wrocław;  
krisw@biol.uni.wroc.pl

#### STRESZCZENIE

Praca jest podsumowaniem badań nad możliwościami rozmnażania *in vitro* zagrożonych gatunków paproci serpentynitowych (*Asplenium adulterinum* i *A. cuneifolium*) oraz związanych z podłożem serpentynitowym populacji *Asplenium septentrionale*. W jej wyniku prześledzono pełny cykl życiowy wybranych gatunków, sprawdzono wpływ pożywki o różnych stężeniach na ich wzrost i przeżywalność oraz utworzono „bank genów” z przedrośli przechowywanych przez rok w niskiej temperaturze. Najlepsze wyniki otrzymano stosując pożywkę MS w rozcieńczeniu do 1/2 makroelementów oraz pożywkę MSZ zmodyfikowaną składem makroelementów dostosowaną do składu podłoża serpentynitowego. Przedrośla sercowate *Asplenium adulterinum* i *Asplenium cuneifolium* najlepiej znosiły przechowywanie w +8°C i świetle o natężeniu 0,15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Otrzymane *in vitro* sporofity udało się aklimatyzować w szklarni, a później w inspekcie. Przeprowadzone badania dowiodły, że paprocie te wymagają średnio zasobnych gleb, a niedostatek lub nadmiar składników odżywczych w podłożu ograniczają tempo ich wzrostu. W przypadku dwóch gatunków uzyskano pełną aklimatyzację, łącznie z tworzeniem zdrowych zarodników w 2 lub 3 roku uprawy. Wyniki pozwalają na wybór optymalnych warunków hodowli dwóch krytycznie zagrożonych gatunków paproci serpentynitowych, w przypadku konieczności zachowania ich populacji *ex situ* w ramach hodowli w wybranym Ogrodzie Botanicznym.

#### WSTĘP

Paprocie są jednymi z najwcześniejszych roślin lądowych – najstarsze znane są z dolnego i środkowego dewonu (Karpowicz 1969). Stanowią niejednorodną grupę, którą reprezentują w większości wysokie poliploidy oraz formy mieszańcowe: międzygatunkowe i międzyrodzajowe (Zenktele 2000). W Polsce występuje 45 gatunków paproci (Zenktele 2000), z czego aż 21,7% podlega różnym kategoriom zagrożenia. Część zalicza się do gatunków wymarłych (4,3%) i wymierających (4,3%), narażonych (8,7%), rzadkich (2,2%) lub zagrożonych (2,2%). Wśród nich na pierwszy plan wysuwają się paprocie związane z podłożem serpentynitowym. Liczba ich stanowisk oraz wielkość populacji ulegają stałym wahaniom, niejednokrotnie prowadząc do całkowitego wymarcia poszczególnych subpopulacji (Świerkosz 1992; Fabiszewski 1993; Żołnierz 1993; Świerkosz & Szczęśniak 2003).

Największe masywy serpentynitowe w Europie występują na Półwyspie Bałkańskim, w Alpach, pld.-wsch. Portugalii i w Wielkiej Brytanii (Roberts & Proctor 1992), zaś w Polsce serpentynity i pokrewne im skały ultramorficzne można spotkać jedynie na terenie Dolnego Śląska (Marszał & al. 1999; Świerkosz & Szczęśniak 2003). Serpentynity są skałami metamorficznymi, powstałymi w wyniku przeobrażenia ultrazasadowych skał magmowych z okresu dewońskiego. Charakteryzują się zielonoszarą barwą oraz specyficznym składem chemicznym, w którym zaznaczają się: niski stosunek wapnia do magnezu, niska zawar-

tość N, P, K, wysoka zawartość Ni, Co i Cr oraz stosunkowo wysokie pH wynoszące 7,2 (Gams 1938; Sarosiek & Sadowska 1961; Proctor & Woodell 1975). Siedliska roślin występujących na serpentynitach są kseryczne, co wywołane jest właściwościami fizycznymi gleb. Gleby te zawierają dużo części szkieletowych i są przepuszczalne dla wody (Fabiszewski & Wojtuń 1981). Na kseryzm zbiorowisk serpentynitowych ma również wpływ rozproszenie porastającej skały roślinności, które powoduje nagrzewanie się podłoża w wyniku docierania do jego powierzchni dużych ilości światła. W wyniku naswietlenia, wysokiej temperatury i parowania gleby mikroklimat siedlisk serpentynitowych jest suchy (Whittaker 1954; Proctor & Woodell 1971). Wszystkie wymienione czynniki decydują o nieurodzajności, a nawet toksyczności opisywanych gleb i nazywane są „kompleksem serpentynitowym” (Sarosiek 1964).

Na siedliskach tych występują liczne gatunki, podgatunki i ekotypy przystosowane do życia w niekorzystnych warunkach, wśród nich także niektóre gatunki paproci z rodzaju *Asplenium*: zanokcica serpentynowa *A. adulterinum* Milde, ciemna *A. adiantum-nigrum* L. oraz klinowata *Asplenium cuneifolium* Viv. Gatunki te znajdują się na „Czerwonej liście roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce” (Zarzycki & Szela 1992) oraz w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin jako gatunki zagrożone wyginięciem (Kaźmierczakowa & Zarzycki 2001). Ostatnie opracowania (Świerkosz & Szczyński 2003) podnoszą kategorię zagrożenia dla zanokcicy serpentynowej oraz ciemnej do CR (krytycznie zagrożonych), jako że ich populacje w Polsce nie przekraczają liczby – odpowiednio – 200 i 350 osobników. Zanokcica serpentynowa jest także gatunkiem dwukrotnie już proponowanym przez Polskę do włączenia na listę Konwencji Berneńskiej (Puchalski & Galera 2001), zaś od maja 2004 znajduje się w zmodyfikowanym załączniku II Dyrektywy 92/43/EEC (Dyrektywa Siedliskowa).

Najmniej narażonym na wymarcie gatunkiem jest zanokcica północna, która jednak lokalnie w Polsce pd. należy do gatunków wymierających (Świerkosz, npbl.), zaś na Dolnym Śląsku została uznana za gatunek „bliski zagrożenia” (kategoria NT).

Podjęty przez autorów ciąg doświadczeń pozwala na rozpoznanie możliwości zachowania

tych taksonów w warunkach *ex situ*, a szczególnie na najbardziej krytycznym dla rozwoju paproci etapie. Cousens i in. (1989) podają bowiem, że większość gametofitów paproci ginie w warunkach *in situ*. Ich przedrośla często nie przeżywają krytycznych faz rozwojowych takich jak kiełkowanie spor, wzrost przedrośli, zapłodnienie i rozwój młodego sporofitu. Natomiast hodowla *ex situ* i kultury *in vitro* zapewniają paprociom niezakłócony wzrost i rozwój (Zenkteler 1992). Celem badań prowadzonych w Pracowni Kultur Tkankowych Wrocławskiego Ogrodu Botanicznego było poznanie wymogów żywieniowych, cyklu reprodukcyjnego oraz całego cyklu życiowego zagrożonych gatunków paproci. Wyniki badań terenowych i laboratoryjnych pomogły w utworzeniu siedliska zastępczego na terenie Ogrodu Botanicznego we Wrocławiu. W późniejszym czasie możliwa jest również reintrodukcja *Asplenium adulterinum* i *Asplenium cuneifolium* na stanowiska ich naturalnego występowania.

## KULTURY IN VITRO W ROZMNAŻANIU PAPROCI

Stosowanie kultur *in vitro* w rozmnażaniu paproci znane było już w latach dwudziestych (Zenkteler 2000). Badania prowadzone w tym czasie dotyczyły kiełkowania zarodników i wzrostu sporofitów *Marsilea* (Allsoop 1952) oraz morfogenezy u *Osmunda* (Morel & Wetmore 1951). W latach siedemdziesiątych technika kultur *in vitro* stała się główną metodą rozmnażania paproci (Loescher & Albrecht 1979; Leffering & Soede 1982; Le 1983; Richards & al. 1983; George & Sherrington 1984; Higuchi & al. 1987). Paprocie rozmnażano głównie przez kultury merystemów wierzchołkowych kłączy i rozłogów (Zenkteler 2000), a zainteresowaniem cieszyły się gatunki z rodzajów *Platyterium* (Hennen & Sheehan 1978), *Pteris* (Kshirsagar & Mehta 1978), *Adiantum*, *Ampelopteris*, *Ceratopteris*, *Cyclosorus* i *Nephrolepis* (Bir & Anand 1982). W literaturze można znaleźć także doniesienia wykazujące, że homogenizacja gametofitów lub sporofitów, a następnie kultura homogenatów w ziemi lub na jałowych syntetycznych pożywkach zwiększa tworzenie sporofitów u określonych gatunków paproci (Cooke 1979). Szczególnie dobre wyniki stosując tą

metodę uzyskano u paproci o szybkim cyklu życiowym, tworzących dużo sporofitów. Gametofity *Woodwardia virginica* i *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* (Fernandez & al. 1999) tworzyły po homogenizacji setki sporofitów, natomiast u *Osmunda regalis* tworzenie sporofitów było całkowicie zahamowane.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał i metody dotyczące pozyskania i odkażania zarodników oraz pierwszego etapu hodowli gametofitów zostały szczegółowo przedstawione w pracach Marszał & al. (1999) i Marszał & Kromer (2000), które podsumowały poprzednie etapy prowadzonych badań.

### Gameofity

**Skład pożywki.** W kolejnych 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 g/dm<sup>3</sup>) i sacharozy (20 g/dm<sup>3</sup>), wyższe pH 6,8–7,0, zmienione proporcje makroelementów oraz o połowę mniej glicyny. Warunki doświadczenia były zbliżone do opisywanych przez Marszał & Kromer (2000). Pojedyncze przedrośla stadium sercowatego *Asplenium adulterinum*, *A. cuneifolium* i *A. septentrionale* umieszczano w kolbkach o pojemności 100 ml, zawierających 35 ml pożywki. Doświadczenie przeprowadzono w czterech powtórzeniach. Powtórzenie stanowiła próba 10 gametofitów. Kultury znajdowały się w pokoju hodowlanym o temperaturze 18–20°C przy oświetleniu wynoszącym 14,2 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> i 16 godzinnym fotoperiodzie.

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

**Hodowla w warunkach ograniczonego wzrostu.** W następnych doświadczeniach opracowywano metody długoterminowego przechowywania przedrośli *Asplenium adulterinum* i *Asplenium cuneifolium*. Pojedyncze przedrośla stadium sercowatego badanych paproci umieszczano w kolbkach o pojemności 50 ml,

zawierających 20 ml pożywki. Badanie przeprowadzono w dwudziestu powtórzeniach. Powtórzenie stanowiła próba 5 gametofitów. Do doświadczeń zastosowano pożywkę MS z poziomem makroelementów zredukowanym do 1/2 i o różnej zawartości agaru i sacharozy. Do pożywki pojedynczo dodawano kinetynę (0,8 mg/dm<sup>3</sup>), IAA (0,1 mg/dm<sup>3</sup>) i GA<sub>3</sub> (1,0 mg/dm<sup>3</sup>). Kultury *in vitro* umieszczano w ladzie chłodniczej o temperaturze: +2°C w całkowitej ciemności i +8°C w świetle o natężeniu 0,15 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> przy 16 godz. fotoperiodzie. Po upływie 12 miesięcy od założenia doświadczenia, zastosowano okres dwutygodniowej adaptacji w temperaturze 18–20°C, po której przedrośla pasażowano na świeżą pożywkę, oceniając przeżywalność i stan gametofitów badanych gatunków paproci.

### Sporofity

**Przygotowanie roślin do wysadzenia w szklarni, zabiegi i pożywki.** Przed przeniesieniem roślin z warunków *in vitro* do *ex vitro*, rośliny kolejno pasażowano z pożywki agarowej na pożywkę płynną z perlitem w stosunku 1:1. Następnie przenoszono kultury *in vitro* ze światła o natężeniu 14,2 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> na światło o natężeniu 34,6 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Po 7 dniach umieszczano kultury w szklarni, a po upływie następnych 5 dni wzrostu w szklarni zdejmowano kapturki z kolbek. Po kolejnych trzech dniach wysadzano rośliny na uprzednio przygotowane podłoże.

**Wysadzanie paproci w warunkach szklarniowych.** Badano wpływ różnego rodzaju podłoża na przeżywalność sporofitów *Asplenium adulterinum*, *Asplenium cuneifolium* i *A. septentrionale*, przeniesionych z kultur *in vitro* na podłoże ogrodnicze w szklarni. Stosowano następujące rodzaje podłoża: firmy Floro-hum do paproci o pH 5,0, mieszankę torfu, ziemi liściowej i piasku (3:2:1), serpentynitowe o pH 7,2 (ze stanowiska naturalnego), firmy Kronen do paproci o pH 6,5 i firmy Kronen do paproci o pH 7,0.

Po upływie 4 tygodni od wysadzenia roślin *ex vitro* oceniano liczbę paproci, które podjęły wzrost na poszczególnych rodzajach podłoża. W celu złagodzenia stresu powstałego w wyniku przeniesienia roślin z warunków *in vitro* do upraw szklarniowych, doniczki umieszczano

w mnożarce i zasłaniano folią. Folię tę stopniowo uchylano: po 10 dniach u *Asplenium adulerinum*, po 2 tygodniach u *A. septentrionale*, a po 3 tygodniach u *A. cuneifolium*. Po kolejnych 2 tygodniach uprawy przenoszono do inspektu.

**Przeniesienie paproci do inspektu.** Po upływie okresu adaptacyjnego w warunkach szklarniowych, przenoszono rośliny do inspektu na uprzednio przygotowane podłoże. Przenieszenie upraw do inspektu miało miejsce na początku maja.

## WYNIKI

Najwcześniej kiełkowały zarodniki *Asplenium adulerinum* (30 dni), a najpóźniej zarodniki *A. septentrionale* (40 dni) i *A. cuneifolium* (40 dni). Gametofity stadium sercowatego, na którym można było obserwować gametangia, wykształciły się po 3 miesiącach u *Asplenium adulerinum*, a po 4 miesiącach u *A. septentrionale* i *A. cuneifolium*. Po upływie 6 miesięcy od skielkowania zarodników otrzymano pierwsze sporofity *Asplenium adulerinum*, a po 8 miesiącach *A. septentrionale* i *A. cuneifolium*.

W pożywkach stosowano pełne stężenie makroelementów i rozcieńczenia do 1/2, 1/4 i 1/8. Poziom makroelementów w różny sposób wpływał na rozwój gametofitów badanych gatunków. Największy przyrost biomasy obserwowano na pożywce MS, w której makroelementy rozcieńczano do 1/2. Równie korzystna była pożywka zmodyfikowana MSZ, o składzie makroelementów zbliżonym do składu podłoża serpentynitowego. Gametofity rosnące na tych stężeniach makroelementów w pożywce rozwijały się prawidłowo i wcześniej wytwarzały sporofity.

Niekorzystną dla rozwoju gametofitów okazała się pożywka zawierająca niewielką zawartość soli (1/8 MS) i, aby zapobiec obumieraniu przedrośli, konieczne było ich częste pasażowanie. Podobne wyniki uzyskano przy pełnym stężeniu soli mineralnych w MS. Najbardziej wrażliwe na zasolenie okazały się przedrośla *Asplenium cuneifolium* (zamieranie w 50%), natomiast najmniej wrażliwe – przedrośla *A. septentrionale* (zamieranie w 10%).

Doświadczenia nad ograniczaniem tempa wzrostu wykazały, że przedrośla sercowate *Asplenium adulerinum* i *Asplenium cuneifo-*

*lium* najlepiej znosiły przechowywanie w +8°C i świetle o natężeniu 0,15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na pożywce 1/2 MS, bez regulatorów wzrostu. Zróznicowanie dawki agaru i sacharozy nie miało wpływu na kondycję przechowywanych gametofitów. Przeniesione na świeżą pożywkę 1/2 MS przedrośla obu gatunków paproci prawidłowo się rozwijały i wytwarzały sporofity. W przeprowadzonych doświadczeniach stosowano gametofity w stadium sercowatym, które podobnie jak dojrzałe przedrośla *Matteuccia struthiopteris* (Zenktele 1992) dobrze znosiły przechowywanie.

Pojawiające się w kulturach gametofitów sporofity oddzielano i przenoszono na pożywkę agarową. Dla poprawy rozwoju systemu korzeniowego sporofitów i ułatwienia aklimatyzacji roślin w uprawie szklarniowej, podobnie jak w doświadczeniach u jabłoni (Kromer 1987) stosowano w warunkach *in vitro* perlit. Przed przeniesieniem roślin z warunków *in vitro* do *in vivo* kultury paproci były hartowane, zaś w początkowym etapie hodowli szklarniowej, z uwagi na charakterystyczne dla roślin otrzymanych *in vitro* słabe zdrewnienie tkanek, niecałkowicie wykształconą tkankę okrywającą oraz niefunkcjonalne aparaty szparkowe i korzenie (por. Jankiewicz 1997) – zastosowano tunele foliowe.

Najkorzystniejsze do prowadzenia upraw szklarniowych wszystkich badanych gatunków paproci było podłoże ogrodowe do paproci o pH 6,5 oraz podłoże serpentynitowe o pH 7,2, pobrane ze stanowiska w Książnicy. Na tych podłożach przeżywalność sporofitów była najwyższa. Dla *Asplenium septentrionale* korzystna była mieszanka torfu, ziemi liściowej i piasku (3:2:1).

Uprawa zachowawcza dwóch spośród badanych gatunków przebiegała prawidłowo i większość roślin zaaklimatyzowała się po przeniesieniu ze szklarni do inspektu. Sporofity *Asplenium adulerinum* w drugim roku uprawy uzyskiwały dojrzałość i wytwarzały zarodniki, u *Asplenium septentrionale* można było obserwować zarodniki dopiero w trzecim roku uprawy. *Asplenium cuneifolium* źle znosiło przeniesienie ze szklarni do inspektu i dalsza uprawa zachowawcza nie przyniosła efektów, gdyż rośliny nie przeżyły jednego miesiąca. Powodem było zniszczenie korzeni w wyniku zerwania szkodników szklarniowych.

## DYSKUSJA

**Skład pożywki.** Zenkteler (1992) 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 pełnym składzie i w rozcieńczeniu do 1/2, 1/4 i 1/8. W jej doświadczeniach pożywki Knopa i Knudsona stosowane w 1/2 ich stężenia okazały się najodpowiedniejszymi. Ta sama autorka (Zenkteler 2000) do rozmnażania kłączy paproci użyła pożywki Murashige Fern Multiplication Medium (1976), która zawiera pełne stężenie makro- i mikroelementów MS (Murashige & Skoog 1962). W swoich badaniach Zenkteler (2000) 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 okazało się rozcieńczenie makroelementów do 1/2. Uzyskane przez autorów wyniki w pełni potwierdzają więc wcześniejsze dane.

Wyniki uzyskane podczas niniejszych badań przy stosowaniu pełnego stężenia MS, powodujące zamieranie części przedrośli, nie są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Fernandez & al. (1997a). Autorzy ci badali wpływ pożywki Knopa (1865), Knudsona (1964), Klekowskiego (1969) oraz wspomnianą już MS w pełnym składzie makroelementów i w rozcieńczeniu do 1/2 i 1/4 na przyrost świeżej i suchej masy gametofitów *Blechnum spicant*. Wyniki wskazywały, 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. Do rozmnażania gametofitów i sporofitów *Asplenium nidus* (Fernandez & al. 1993) oraz *Blechnum spicant* i *Pteris ensiformis* (Fernandez & al. 1996a) także zastosowano pożywkę MS w pełnym składzie makroelementów, która okazała się przydatna dla namnażania wymienionych gatunków.

Pożywki ubogie w sole mineralne (Knopa, Knudsona i Klekowskiego), a szczególnie ostatnia z nich, 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 (Fernandez & al. 1997b). Fernandez & al. (1996b) badali również wpływ stężenia soli w pożywce na występowanie zjawiska apogamii u *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*. Okazało się, że pełne stężenie soli w pożywce stymulowało tworzenie się największej liczby sporofitów, ale powstały one na drodze apogamii. Reprodukacja przez zapłodnienie była niemożliwa, ponieważ nie obserwowano rodni na gametofitach.

Badania własne i doniesienia literaturowe pozwalają więc stwierdzić, że warunki żywieniowe, tak jak inne czynniki fizyczne i chemiczne, istotnie wpływają na przebieg namnażania 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 podłoża bogate w składniki pokarmowe może ograniczać ich rozwój, a zatem i ekspansję. Dlatego prawdopodobnie paprocie te rosną na serpentynitach, które charakteryzuje nieurodzajność, a nawet ograniczająca wzrost innych gatunków, toksyczność.

**Hodowla w warunkach ograniczonego tempa wzrostu.** Metoda utrzymywania kultur *in vitro* w warunkach ograniczonego tempa wzrostu polega na zapewnieniu uzyskanym tkankom lub zregenerowanym roślinom minimalnych potrzeb dla ich wzrostu, tak aby przeciwdziałać ich starzeniu się (Withers 1991; Puchalski 1998). Aby osiągnąć te efekty używa się pożywek uboższych w składniki mineralne, obniża się temperaturę hodowli, zmniejsza intensywność światła, stosuje inhibitory wzrostu, inhibitory osmotyczne, retardanty oraz zmienia się stężenie regulatorów wzrostu (Ashmore 1997).

Zenkteler (1992) badała wpływ ciemności i światła na dwa stadia rozwojowe przedrośli *Matteuccia struthiopteris* podczas rocznego okresu ich przechowywania w warunkach obniżonej temperatury. Stwierdziła, że brak światła

i działanie niskiej temperatury były niekorzystne we wczesnym stadium rozwojowym gametofitów (stadium nitki). Przedrośla źle znosiły proces adaptacji i wykazywały zakłócenia w gametogenezie. Do przechowywania najlepiej nadawały się dojrzałe przedrośla sercowate, gdyż posiadały one już wykształcone organy płciowe i wytwarzały sporofity (Zenkteler 1992).

W badanym przypadku stwierdzono, że dla rodzaju *Asplenium* również najkorzystniejsze jest przechowywanie dojrzałych przedrośli sercowatych, co potwierdza cytowane wyniki Zenkteler (1992).

**Podłoże.** Do ukorzenia roślin w warunkach *in vitro* stosowany był perlit. Przeniesienie roślin z pożywki agarowej na pożywkę płynną z perlitem powodowało lepsze ukorzenie się badanych gatunków paproci. Także Goller i Rybczyński (1995) przenosili sporofity drzewiastej paproci *Cyathea australis* do perlitu, w którym rozwijał się system korzeniowy pozwalający na łatwą adaptację do warunków glebowych w szklarni. Przed przeniesieniem roślin z warunków *in vitro* do *in vivo* kultury paproci były hartowane. Zastosowana w doświadczeniu metoda hartowania otrzymanych *in vitro* sporofitów okazała się niezwykle skuteczna, jako etap pośredni pomiędzy kulturą a uprawą szklarniową roślin.

Znane są rośliny, które przeniesione z podłoża serpentynitowego na podłoże ogrodowe wykazywały zaburzenia wzrostu i cyklu życiowego (Pancaro & al. 1978). Cytowani autorzy zauważyli, że zawartość niklu u *Alyssum bertolonii* pobranej z gleb serpentynitowych Toskanii wahała się od 231 do 340  $\mu\text{M/g}$  s.m. (zależnie od pory roku), a rosnącej w glebie ogrodowej obniżała się do 0,56–0,65  $\mu\text{M/g}$  s.m. W glebie ogrodowej roślina ta rosła źle, dlatego wywnioskowano, że nikiel jest niezbędny do prawidłowego przebiegu procesów życiowych u tego gatunku, a prawdopodobnie także innych roślin związanych z tym podłożem (Sarosiek & Sadowska 1961).

Paprocie serpentynitowe rosną jednak tak samo dobrze na glebie ogrodowej o odczynie obojętnym jak i na podłożu serpentynitowym, które charakteryzuje się całkowicie odmiennym składem chemicznym oraz nieurodzajnością, a nawet toksycznością dla roślin. U badanych gatunków zależności takiej więc nie potwierdzono.

## SUMMARY

*Asplenium adulterinum* Milde and *A. cuneifolium* Viv. recorded in Poland exclusively in Dolny Śląsk Region. This rare and endangered species grow in crevices of poorly lime and molybdenum-yielding, high chromium, magnesium, cobalt and nickel serpentinite rocks and scree. The sites normally receive considerable direct sunshine. This evergreen ferns grow exclusively in a restricted serpentine area and therefore the distribution of the populations is patchy and the populations are isolated one from other. 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 environmental 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. The usefulness of *in vitro* culture methods of spore planting and prothallium storage of rare, threatened and protected fern species were been tested. *In vitro* method gives possibility to consider 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 are intended to conserve fern cultivation in the Botanical Garden of the Wrocław University in Wrocław. It is also possible to create a "gene bank" from prothallium storage of threatened ferns.

## LITERATURA

- Allsoop A. 1952. Experimental and analytical studies of pteridophytes. 17. The effect of various physiologically active substances on the development of *Marsilea* in serile culture. Ann. Bot. 16: 165-184.
- Ashmore S. E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 67ss.

- Bir S. S. & Anand M. 1982.** Morphogenetic studies on pteridophytes in India. Aspects of Plant Sci. 6: 105-118.
- Cooke W. 1979.** Homogenization as an aid in tissue culture propagation of *Platyserium* and *Davallia*. HortScience, 14(1): 21-22.
- Cousens M. I. Kelly E.M. Coffman W. 1989.** New demographic finding and sampling effort for a population of fern. Am. J. Bot. 76: 202.
- Fabiszewski J. 1993.** Problemy ochrony szaty roślinnej w obszarze wzgórz Słęzy. Annales Silesiae, vol. XXIII.
- Fabiszewski J. & Wojtuń B. 1981.** Badania zawartości niektórych makroelementów w roślinach i glebach serpentynitowych oraz bazaltowych. Manuskrypt.
- Fernandez H. Bertrand A. & Sanchez-Tames R. 1993.** *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. From gametophytic and sporophytic tissue. Scientia Hortic. 56: 71-77.
- Fernandez H. Bertrand A. & Sanchez-Tames R. 1996a.** Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44: 261-265.
- Fernandez H. Bertrand A. & Sanchez-Tames R. 1996b.** Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 45: 93-97.
- Fernandez H. Bertrand A., Feito I. & Sanchez-Tames R. 1997a.** Gametophyte culture *in vitro* and antheridiogen activity in *Blechnum spicant*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50: 71-74.
- Fernandez H. Bertrand A. & Sanchez-Tames R. 1997b.** Germination in *Osmunda regalis* L. gametophyte cultured *in vitro*. Plant Cell Reports. 16: 358-362.
- Fernandez H. Bertrand A. & Sanchez-Tames R. 1999.** Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56: 211-214.
- Gams H. 1938.** Ökologie der extratropischen Pteridophyten. Boden. Manual of Pteridology. Pp. 394. Hague.
- George E. F. & Sherrington P. D. 1984.** Commercial tissue culture laboratories. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics, Basingstoke, pp. 549-594.
- Goller K. & Rybczyński J. J. 1995.** *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R.Br.). Domin vegetative propagation. Acta Soc. Bot. Pol. 64: 13-17.
- Hennen G. R. & Sheehan T. J. 1978.** *In vitro* propagation of *Platyserium stemaria*. Hort Science. 13: 245.
- Higuchi H., Amaki W. & Suzuki S. 1987.** *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordiflora*. Scientia Hortic. 32: 105-113.
- Jankiewicz L. S. 1997.** Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Karpowicz W. 1969.** Paprocie. Warszawa, PWN.
- Każmierczakowa R. & Zarzycki K. (red.) 2001.** Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i Rośliny Kwiatowe. PAN, Inst. Bot. im. W. Szafera i Inst. Ochrony Przyrody, Kraków.
- Klekowski E. J. jr. 1969.** Reproductive biology of the pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. Bot. J. Linn. Soc. 62: 361-377.
- Knop W. 1865.** Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch Vers. Stn. 7: 93-107.
- Knudson L. 1946.** A nutrient solution for the germination of orchid seed. Bull. Am. Orchid. Soc. 15: 214-217.
- Kromer K. 1987.** Hardening and rooting of M 7 apple rootstock cultures. Symposium Plant Micropropagation in Horticultral Industries, Preparation, hardening and acclimatization processes, Arlon, Belgium, August 10-14, 1987.
- Kshirsagar M. K. & Mehta A. R. 1978.** *In vitro* studies in ferns: Growth and differentiation in rhizome callus of *Pteris vittata*. Phytomorph. 33: 50-58.
- Le C. E. 1983.** Essai de multiplication de *Nephrolepis exaltata* par culture *in vitro* de tissu gametophytique. Rev. Suis Vitic. Arboric. Hortic. 15: 189-192.
- Leffering L. & Soede A. C. 1982.** Influence of salt concentration on the homogeneity of *Nephrolepis* plants from tissue culture. In: A. Fujiwara (Editor), Plant Tissue Culture. Abe Printing Co., Tokyo, pp. 499-500.
- Loescher W. H. & Albrecht C. N. 1979.** Development *in vitro* of *Nephrolepis exaltata* cv *Bostoniensis* by runner tissue. Physiol. Plant. 47: 250-254.
- Marszał J., Kromer K. & Nowak T. J. 1999.** Ochrona paproci serpentynitowych z Masywu Słęzy i możliwości ich rozmnażania *in vitro*. Prace Ogródu Botanicznego Uniwersytetu Wrocławskiego 5(1): 415-422.

- Marszał J. & Kromer K. 2000.** Zastosowanie kultur *in vitro* w ochronie rzadkich i ginących gatunków paproci serpentynitowych. Biul. Ogr. Bot. Muzeów i Zb. 9: 141-146.
- Morel G. & Wetmore R. M. 1951.** Fern callus tissue culture. Am. J. Bot. 38: 141-143.
- Murashige T. & Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pancaro L., Pelosi P., Vergnano Gambi O. & Gallopin C. 1978.** Ulteriori indagini sul rapporto tra nichel e acidi malico e malonico in *Alyssum*. *Gior. Bot. Ital.* 112: 141-146.
- Proctor J. & Woodell S. R. J. 1971.** The plant ecology of serpentine. I. Serpentine vegetation of England and Scotland. *J. Ecol.* 59(2): 375-395.
- Proctor J. & Woodell S. R. J. 1975.** The ecology of serpentine soils. [In:]: A. Macfadyen (ed.), *Advances in Ecological Research.* 255-366.
- Puchalski J. 1998.** Długotrwałe przechowywanie plazmy zarodkowej roślin użytkowych – metody i problemy. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych.* 463: 211-233.
- Puchalski J., Galera H. 2001.** Zadania dla polskich ogrodów botanicznych w zakresie ochrony roślin w skali europejskiej zgodnie z konwencją berneńską. *Biul. Ogr. Bot. Muzeów i Zb.* 10: 85-94.
- Richards J. H., Beck J. Z. & Hirsch A. M. 1983.** Structural investigation of asexual reproduction in *Nephrolepis exaltata* and *Platyserium bifurcatum*. *Am. J. Bot.* 70: 993-1001.
- Roberts B. A. & Proctor J. 1992.** The ecology of areas with serpentinized rocks. A word view. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 427 pp.
- Sarosiek J. 1964.** Ekologiczna analiza roślin gleb serpentynowych z Dolnego Śląska. *Monographiae Botanicae.* 18: 3-106.
- Sarosiek J. & Sadowiska A. 1961.** Ekologia roślin gleb serpentynowych. *Wiad. Bot.* 5(1): 73-86.
- Świerkosz K. 1992.** Podkolan biały *Plantanthera bifolia* i zanokcica ciemna *Asplenium adiantum-nigrum* w Górach Ołowianych. *Chron. Przyr. Ojcz.* 48(1): 96-100.
- Świerkosz K. & Szczęśniak E. 2003.** Stan populacji i zagrożenia wybranych gatunków naskalnych na Dolnym Śląsku [The State of Populations and Threats to Chosen Petricolous Plant Species in Lower Silesia] – [w:] Z. KAŃKI [red.] *Zagrożone gatunki flory naczyniowej Dolnego Śląska.* pp. 69-83. Instytut Biologii Roślin UWr – PTOP „pro Natura”, Wrocław.
- Whittaker R. H. 1954.** The vegetational response to serpentine soils. *Ecology.* 35: 275-288.
- Withers L. A. 1991.** *In vitro* conservation. *Biol. J. Linn Soc. (London).* 43: 31-42.
- Zarzycki K. & Szeląg Z. 1992.** Czerwona lista roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce. W: Zarzycki K., Wojewoda W., Heinrich Z., (red.), *Lista roślin zagrożonych w Polsce.* Wyd. 2. Inst. Botaniki PAN, Kraków.
- Zenkteler E. 1992.** Metoda *in vitro* w rozmnażaniu i okresowym przechowywaniu chronionych oraz rzadkich i ginących gatunków paproci. *Hod. Rośl. Nasien.* 5: 20-30.
- Zenkteler E. 2000.** Systemy wegetatywnego rozmnażania paproci *in vivo* oraz *in vitro*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- Żołnierz L. 1993.** Paprocie serpentynitowe w Masywie Ślęży. *Annales Silesiae* 23: 77-90.