



Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

Kierunek studiów: Ogrodnictwo

Specjalność: Ogrodnictwo z marketingiem

Rafał Kobak

Nr albumu: 57053

**Badania nad mikrorozmnażaniem gatunków
ginących na przykładzie śnieżycy karpackiej i
szachownicy kostkowej.**

Spis treści

1. WSTĘP	5
2. PRZEGŁĄD LITERATURY	6
2.1. Śnieżyca wiosenna odmiana karpacka <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet	
6	
2.1.1. Charakterystyka rodziny <i>Amaryllidaceae</i>	7
2.1.2. Morfologia.....	7
2.1.3. Biologia i siedlisko.....	11
2.1.4. Występowanie	12
2.1.5. Zagrożenia i ochrona	13
2.2. Szachownica kostkowata <i>Fritillaria meleagris</i> L.	14
2.2.1. Charakterystyka rodziny <i>Liliaceae</i>	15
2.2.2. Morfologia.....	15
2.2.3. Biologia i siedlisko.....	18
2.2.4. Występowanie	19
2.2.5. Zagrożenia i ochrona	20
2.3. Ochrona ginących gatunków roślin w Polsce.....	22
2.3.1. Metody ochrony ginących gatunków roślin	23
2.3.2. Banki tkanek <i>in-vitro</i>	24
2.4. Etapy mikrorozmnażania.....	26
2.5. Mikrorozmnażanie <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet.....	28
2.5.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej	29
2.5.2. Etap I – inicjacja kultury	30
2.5.3. Etap II – namnażanie	32
2.5.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów	32
2.5.5. Etap IV – aklimatyzacja	36

2.6. Mikrorozmnażanie <i>Fritillaria meleagris</i> L.	37
2.6.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej	38
2.6.2. Etap I – inicjacja kultury	38
2.6.3. Etap II – namnażanie	40
2.6.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów	41
2.6.5. Etap IV – aklimatyzacja	43
3. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ.....	44
3.1. Śnieżyca karpacka <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet	44
3.1.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej.....	44
3.1.2. Etap I – inicjacja kultury	52
3.1.3. Etap II – namnażanie	64
3.1.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów	65
3.1.5. Etap IV – aklimatyzacja	72
3.1.6. Badanie żywotności pyłku	72
3.2. Szachownica kostkowata <i>Fritillaria meleagris</i> L.	75
3.2.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej.....	75
3.2.2. Etap I – inicjacja kultury	80
3.2.3. Etap II – namnażanie	95
3.2.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów	95
3.2.5. Etap IV – aklimatyzacja	99
3.2.6. Badanie żywotności pyłku	100
4. WYNIKI ORAZ DYSKUSJA	101
4.1. Zakażenia w doświadczeniu	101
4.1.1. Zakażenia w kulturach <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet – dokumentacja fotograficzna	101
4.1.2. Zakażenia w kulturach <i>Fritillaria meleagris</i> L. – dokumentacja fotograficzna	
109	
4.1.3. Ilość zakażeń oraz wpływ rodzaju eksplantatu na ilość zakażeń	117

4.1.4. Wpływ dodatku antybiotyku w pożywce na ilość zakażeń.....	120
4.1.5. Wpływ modyfikacji metody odkażania łusek liściowych u <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet na ilość zakażeń.....	123
4.1.6. Skuteczność kultur ratunkowych	124
4.2. Regeneraty otrzymane po I etapie doświadczenia.....	126
4.2.1. Organogeneza bezpośrednia pędowa w kulturach <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet, I etap	126
4.2.2. Organogeneza bezpośrednią pędową w kulturach <i>Fritillaria meleagris</i> L. 139	
4.2.3. Organogeneza korzeniowa u obu gatunków	147
4.2.4. Kultury które nie podjęły regeneracji.....	149
4.2.5. Ilość eksplantatów, która podjęła regenerację oraz czas potrzebny do pojawienia się regeneratów w kulturach	152
4.2.6. Wpływ rodzaju eksplantatu na ilość uzyskanych regeneratów	157
4.3. Wynik doświadczenia z nasionami <i>Fritillaria meleagris</i> L.	160
4.4. Rozwój regeneratów III etapie mikrorozmnażania	161
4.5. Żywotność pyłku <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet	166
4.6. Żywotność pyłku <i>Fritillaria meleagris</i> L.	169
5. WNIOSKI	175
6. BIBLIOGRAFIA	177
7. ZAŁĄCZNIKI	180

1. WSTĘP

Cześć gatunków objętych ochroną prawną w Polsce występuje jedynie na kilku stanowiskach. Istnieje więc ryzyko, że przypadku zniszczenia tych stanowisk np. poprzez osuszenie wilgotnych łąk, gatunki takie mogą zniknąć z krajowej flory. Wraz z rozwojem technik *in-vitro* pojawiła się możliwość masowego rozmnażania roślin z pojedynczych osobników. Mikrorozmnażanie o którym mowa może być bardzo efektywną formą rozmnażania wegetatywnego, jednakże procedury rozmnażania *in-vitro* są często specyficzne dla konkretnych gatunków i wymagają indywidualnego opracowania. Dzięki optymalizacji tych procedur możliwe stanie się masowe rozmnożenie zagrożonych gatunków przypadku wystąpienia nagłej potrzeby – czy to zniszczenia stanowiska naturalnego czy też konieczności zaspokojenia potrzeb rynku.

Celem pracy są badania nad mikrorozmnażaniem dwóch gatunków roślin cebulowych będących w Polsce pod ochroną prawną, śnieżycy wiosennej odmiany karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet (ochrona częściowa) oraz szachownicy kostkowej *Fritillaria meleagris* L. (ochrona ścisła).

Oba gatunki są roślinami występującymi na mokrych i żyznych łąkach. Istnieje kilka sposobów mikrorozmnażania roślin, w niniejszej pracy użytą zostanie metoda organogenezy bezpośredniej to jest powstawania pąków przybyszowych bezpośrednio w tkankach eksplantatu. Największy nacisk będzie położony na zbadanie wpływu rodzaju eksplantatu na współczynnik rozmnażania. Wykorzystane w doświadczeniu rodzaje eksplantatów to fragmenty blaszki liściowej, łuski spichrzowej cebuli, piętki oraz płatka korony – tutaj jedynie w przypadku szachownicy kostkowej. Rośliny będące źródłem eksplantatów zostaną pozyskane z środowiska naturalnego za zgodą odpowiednich organów. Skład pożywki będzie bazował na istniejących publikacjach naukowych dotyczących obu gatunków. W razie potrzeby opisane pożywki czy metody odkażania będą modyfikowane. Kultury będą prowadzone na pożywkach stałych w szalkach petriego w laboratorium zakładu genetyki, hodowli roślin i biotechnologii wydziału ogrodniczego oraz zostaną zakończone w momencie otrzymania mikrocebulek, będących materiałem rozmnożeniowym w przypadku roślin cebulowych. Dodatkowo w ramach pracy zbadane zostaną wpływ położenia eksplantatu w pożywce na ilość zregenerowanych roślin oraz wpływ różnych metod odkażania na ilość zakażeń w kulturach.

Rzadkość występowania badanych gatunków roślin może być spowodowana niską efektywnością rozmnażania tych gatunków naturze. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być niska żywotność pyłku. W celu sprawdzenia tej tezy zbadana zostanie żywotność pyłku dla obu gatunków. Z trzech kwiatów każdego gatunku zostanie pobrany pyłek i za pomocą dwóch barwników zostanie oceniony stosunek pyłku żywego do martwego.

2. PRZEGŁĄD LITERATURY

2.1. Śnieżyca wiosenna odmiana karpacka *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Nazwa rodzaju *Leucojum* pochodzi od słów *leuc* co znaczy biały [1], oraz *rum* znaczy fiołek [1], więc całkowicie nazwę rodzajową *Leucojum* można przetłumaczyć jako biały fiołek. Nazwa gatunkowa *vernus* pochodzi od *vern* to jest wiosenny. Poniżej kilka słów na temat systematyki tej rośliny. Według „The Plant List” [2] oraz WCSP [3] śnieżyca karpacka ma obecnie status odmiany botanicznej śnieżycy wiosennej – jej pełna nazwa według IPNI [4] to *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, Hort. Brit. [Sweet] [2]: 408 (1826). Roślina ta została w tym ujęciu opisana w 1826 roku w publikacji „Sweet's Hortus britannicus : or a catalogue of plants cultivated in the gardens of Great Britain, arranged in natural orders” przez angielskiego botanika Robert'a Sweet'a. W przeszłości pozycja taksonomiczna tej rośliny była kilkukrotnie zmieniana. Była uważana zarówno za podgatunek śnieżycy wiosennej – *Leucojum vernum* subsp. *carpathicum* (Loudon) A.E.Murray, Kalmia 13: 9 (1983), jak i samodzielny gatunek – *Leucojum carpathicum* (Sweet) Sweet, Hort. Brit. [Sweet], ed. 2. 516 (1830). Prawdopodobnie ze względu na to ostatnie, w języku polskim również często jest używana skrócona nazwa – śnieżyca karpacka. Precyzyjną nazwą, jest śnieżyca wiosenna odmiana karpacka lub śnieżyca wiosenna w odmianie karpackiej.



Rys. 2.1. Śnieżyca karpacka *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

W niniejszej pracy w odniesieniu o badanej rośliny używana będzie forma skrócona *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, natomiast w przypadku nazwy polskiej zarówno nazwy śnieżyca karpacka jak i śnieżyca wiosenna w odmianie karpackiej.

Roślina w swoim naturalnym środowisku przedstawiona została na Rys. 2.1. Śnieżyca wiosenna, również jej odmiana karpacka jest rośliną trującą ze względu na wysoką zawartość alkaloidów, głównie leukoiny oraz galantaminy.

2.1.1. Charakterystyka rodziny *Amaryllidaceae*

Śnieżyca karpacka jest przedstawicielem rodziny *Amaryllidaceae* (amarylkowatych). Rośliny z tej rodziny są bylinami, bylinami cebulowymi lub bylinami kłączowymi. Kwiaty występują pojedynczo lub zebrane są w pozorne baldachy. Symetria kwiatu jest promienista. Okwiat jest niezróżnicowany na kielich i koronę, mówimy, więc tutaj o działkach okwiatu. Okwiat u przedstawicieli rodziny amarylkowatych składa się z dwóch okółków a każdy z nich składa się z trzech elementów – działek okwiatu. Mówimy, zatem, że okwiat jest trójkrotny. Pręcikowie składa się z dwóch okółków, po trzy pręciki w każdym. Słupkowie składa się z pojedynczego dolnego słupka powstałego z trzech owocolistków. Owocem jest torebka, rzadziej jagoda. Wzór kwiatowy dla przedstawicieli rodziny *Amaryllidaceae* wygląda następująco: * $P_{3+3}A_{3+3}G_{(3)}$.

2.1.2. Morfologia

Schematyczna morfologia śnieżycy karpackiej została przedstawiona na

Rys. 2.2. Wysokość przedstawicieli tego gatunku dochodzi do 30 cm. Roślina posiada przekształcony pęd podziemny w postaci cebuli. Cebula tego gatunku jest w kształcie kulista, lekko wydłużona w górnej części, jej średnica w najszerzym miejscu wynosi około 3 cm. Jest to cebula wieloletnia, tunikowa, zamknięta. Cebula śnieżycy karpackiej w stanie spoczynku przedstawiona została na

Rys. 2.3.



Rys. 2.2. Morfologia śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet [5]



Rys. 2.3. Cebula śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet [6]

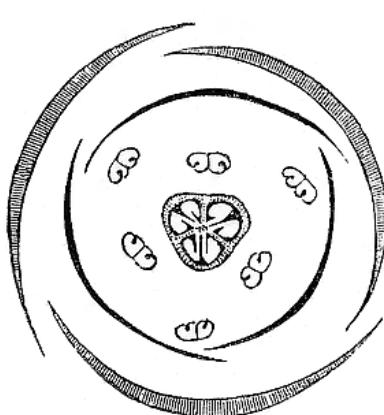
Liście zielone, odziomkowe w liczbie 3-4, równowąskie o szerokości około 4-13 mm, tępo zakończone. Łodyga wzniesiona, bezlistna, nierożgażiona, wyższa od liści. Na szczycie zwykle dwa kwiaty, zdarzają się również osobniki z jednym kwiatem jak i trzema kwiatami (rzadko). Kwiaty zebrane w kwiatostany, pozorne baldachy. Łodygę przedstawiono na

Rys. 2.4.



Rys. 2.4. Pęd kwiatostanowy śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Pojedynczy kwiat jest dzwonkowaty, zwieszony. Okwiat niezróżnicowany zebrany w dwa okółki po trzy działa okwiatu, każdy w kolorze białym z żółtą łączką przy wierzchołku. Pręcików sześć w dwóch okółkach po trzy. Nitka pręcikowa koloru białego, główka koloru żółtego, składająca się z dwóch pylników. Słupek dolny, pojedynczy, z szyjką zgrubiałą o kolorze białym, szczytową częścią na której osadzone jest znamię zabarwioną na kolor zielony. Kwiat pachnący. Narys kwiatowy oraz wnętrze rzeczywistego kwiatu przedstawiono na Rys. 2.5.



Rys. 2.5. Narys kwiatowy [7] oraz kwiat śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Owocem jest mięsista, okrągła torebka wypełniona nasionami. Niedojrzałe owoce przedstawiono na

Rys. 2.6.



Rys. 2.6. Owoce śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

2.1.3. Biologia i siedlisko

Bylina, według klasyfikacji Raunkiaera jest to roślina skrytopączkowa (kryptofit), dokładniej geofit, będąc jeszcze bardziej precyzyjnym geofitem cebulowym. Pączki odnawiające znajdują się więc w podziemnych cebulach.

Roślina kwitnie w marcu i kwietniu. Śnieżyca karpacka jest owadopylna, zapylienia dokonują głównie pszczoły. Nasiona są roznoszone głównie za pośrednictwem mrówek – występuje tutaj myrmekochoria. Roślina rozmnaża się również wegetatywnie poprzez wytwarzanie cebul potomnych. Ze względu na ten sposób rozmnażania rośliny często rosną w kępach. Występuje zwykle w dużych populacjach po kilka tysięcy osobników – Rys. 2.7. Liczba chromosomów $2n = 22$.



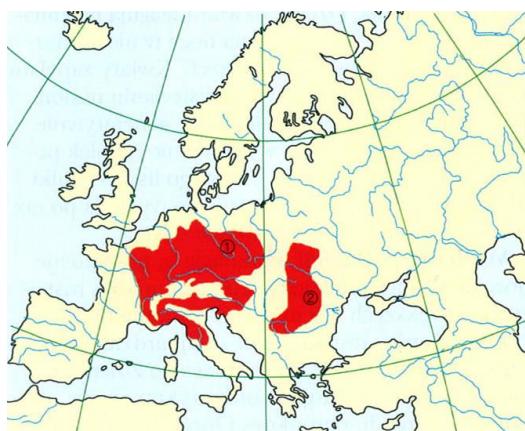
Rys. 2.7. Populacja śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w Dwerniczku

Rośnie na wilgotnych i podmokłych łąkach oraz zaroślach. Wymaga gleb zasobnych, eutroficznych o odczynie od lekko kwaśnego do zasadowego – pH 5,5-8,0. Występuje na glebach brunatnych i madach. Śnieżyca karpacka jest związana z zespołem olszynki karpackiej *Alnetum incane*.

2.1.4. Występowanie

Śnieżyca karpacka występuje w środkowej Europie, jest subendemitem wschodniokarpackim. Występuje na Słowacji, Ukrainie, Rumunii a także w Polsce. W Polsce przebiega północna granica zasięgu. Na

Rys. 2.8 przedstawiono występowanie śnieżycy karpackiej na świecie. Czerwona plama oznaczona numerem 2 odnosi się do terenu gdzie występuje śnieżyca wiosenna w odmianie karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, natomiast czerwona plama z numerem 1 odnosi się do występowania śnieżycy wiosennej w odmianie typowej – *Leucojum vernum* var. *vernus*.



Rys. 2.8. Występowanie obu odmian śnieżycy wiosennej na świecie:
1 – odmiana typowa, 2 – odmiana karpacka [8]

W Polsce mamy okazje obserwować w naturalnym środowisku obie odmiany botaniczne śnieżycy wiosennej. W przypadku odmiany karpackiej występowanie ogranicza się jedynie do Bieszczadów –

Rys. 2.9. Występuje na wysokościach od 530 do 1180 m n.p.m. Można ją spotkać między innymi w rezerwacie przyrody „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku” na terenie gminy Lutowiska w województwie podkarpackim.



Rys. 2.9. Występowanie obu odmian śnieżycy wiosennej w Polsce:
1 – odmiana typowa, 2 – odmiana karpacka [8]

2.1.5. Zagrożenia i ochrona

Według klasyfikacji opublikowanej przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody (IUCN), śnieżyca karpacka została wraz z całym gatunkiem śnieżycy wiosennej zakwalifikowana do kategorii – gatunek narażony na wyginięcie *VU*.

Przyczyną narażenia gatunku na wyginięcie jest przede wszystkim niszczenie jej siedlisk, osuszanie podmokłych łąk, regulacja koryt rzecznych. Ponadto nie bez wpływu pozostaje zrywanie roślin, oraz przesadzanie roślin z stanowisk naturalnych do własnych ogrodów.

Cały gatunek śnieżycy wiosennej wraz z podgatunkami znajduje się w Polsce od 2014 roku pod ochroną gatunkową częściową. Przed 2014 rokiem gatunek ten znajdował się pod ochroną gatunkową ścisłą. Obecnie gatunek jest chroniony między innymi w rezerwacie florystycznym „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku” – Rys. 2.10. Rezerwat został utworzony dnia 27 września 2011 roku na terenie gminy Lutowiska. Powierzchnia rezerwatu to 4,94 ha.



Rys. 2.10. Rezerwat florystyczny „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku” [9]

2.2. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris* L.

Jedna z piękniej kwitnących roślin w rodzimej florze. Naukowa nazwa rodzaju *Fritillaria* pochodzi z łaciny od słowa *fritill* co oznacza kubek do gry w kości [1]. Polska nazwa rodzajowa nawiązuje do charakterystycznego wzoru na działkach okwiatu. Nazwa gatunkowa pochodzi od imienia *Meleager*, mitycznego bohatera. Według mitologii po jego śmierci jego siostry zamieniły się w perliczki a ich łzy w perły [1].

Poniżej kilka słów na temat systematyki tej rośliny. Według „The Plant List” [2], WCSP [3] oraz IPNI [4] obowiązująca pełna nazwa tej rośliny to *Fritillaria meleagris* L., Sp. Pl. 1: 304 (1753). Szachownica kostkowata została opisana po raz pierwszy w 1753 roku w dziele „*Species Plantarum*” szwedzkiego botanika Karola Linneusza, autora między innymi koncepcji binominalnego nazewnictwa biologicznego. W przeszłości gatunek ten był zaliczany do rodzaju Lilia *Lilium* jako *Lilium meleagris* E.H.L.Krause, Deutschl. Fl. (Sturm), ed. 2. 1: 91 (1906). W niniejszej pracy w odniesieniu do badanej rośliny używana będzie forma skrócona *Fritillaria meleagris* L.



Rys. 2.11. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris* L. [10]

Roślina w stadium kwitnienia przedstawiona została na Rys. 2.11. Szachownica kostkowata jest rośliną trującą ze względu na zawartość alkaloidu, imperialiny.

2.2.1. Charakterystyka rodziny *Liliaceae*

Szachownica kostkowata jest przedstawicielem rodziny *Liliaceae* (liliowatych). Rośliny z tej rodziny są bylinami cebulowymi lub bylinami kłączowymi. Kwiaty występują pojedynczo lub zebrane są w kwiatostany – grona lub wiechy. Symetria kwiatu jest promienista. Podobnie jak w rodzinie amarylkowatych okwiat jest niezróżnicowany na kielich i koronę. Okwiat u przedstawicieli rodziny liliowatych składa się z dwóch okółków a każdy z nich składa się z trzech elementów – działek okwiatu. Mówimy zatem, że okwiat jest trójkrotny. Pręcikowie składa się z dwóch okółków, po trzy pręciki w każdym. Słupkowie składa się z pojedynczego górnego słupka powstałego z trzech owocolistków. Owocem jest torebka lub jagoda. Wzór kwiatowy dla przedstawicieli rodziny *Liliaceae* wygląda następująco: $* P_{3+3} A_{3+3} G_{(3)}$.

2.2.2. Morfologia

Schematyczna morfologia szachownicy kostkowej została przedstawiona na

Rys. 2.12. Przedstawiciele tego gatunku osiągają wysokość 15-40 cm.



Rys. 2.12. Morfologia szachownicy kostkowej *Fritillaria meleagris* L. [5]

Przedstawiciele tego gatunku posiadają przekształcony pęd podziemny w postaci cebuli. Cebula tego gatunku jest spłaszczona o średnicy 2-2,5 cm. Cebula jest wieloletnia, łuskowa, otwarta. Cebule mogą unosić się na powierzchni wody, kiedy siedlisko jest zalane. Cebula szachownicy kostkowej w stanie spoczynku przedstawiono na

Rys. 2.13.



Rys. 2.13. Cebula szachownicy kostkowej *Fritillaria meleagris* L. [6]

Liści odziomkowych brak. Łodyga zabarwiona na lekko czerwono, ulistniona. Ulistnienie skrętoległe. Liści 4-5. Pojedyncze liście niebieskawozielone, siedzące, o długości do 15 cm, równowąskie, rynienkowate. Na szczytce łodygi pojedynczy kwiat. Pęd szachownicy kostkowej przedstawiono na

Rys. 2.14.



Rys. 2.14. Pęd szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L.

Kwiat jest kształtu dzwonkowatego o długości około 3-4 cm, zwieszony. Działki okwiatu zebrane w dwa okółki po trzy, każdy w jednakowym kolorze. Kolor podstawowy działek okwiatu to czerwonobrunatny z białym wzorem przypominającym szachownicę. Zdarzają się osobniki o całkowicie białych działkach okwiatu. Pręcików sześć w dwóch okółkach. Pręciki na krótkich nitkach, główka koloru żółtego składająca się z dwóch pylników. Słupek górny, z dużym trójdzielnym znamieniem koloru żółtobiałego. Kwiat bezwonny. Narys kwiatowy oraz wnętrze rzeczywistego kwiatu przedstawiono na

Rys. 2.15.



Rys. 2.15. Narys kwiatowy [11] oraz kwiat szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L.

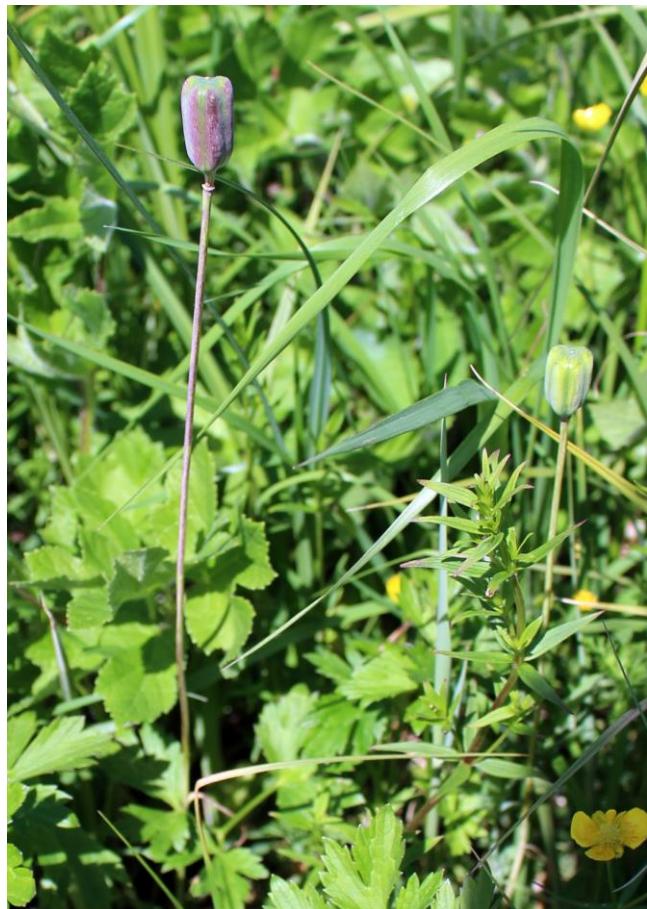
Owocem jest trójgraniasta torebka wypełniona nasionami. Niedojrzałe owoce szachownicy kostkowatej przedstawiono na

Rys. 2.16 oraz

Rys. 2.17.



Rys. 2.16. Niedojrzałe owoce szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L.



Rys. 2.17. Niedojrzałe owoce szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L.

2.2.3. Biologia i siedlisko

Bylina, według klasyfikacji Raunkiaera jest to roślina skrytopączkowa (kryptofit), dokładniej geofit, dalej geofit cebulowy. Pączki odnawiające znajdują się więc w podziemnych cebulach.

Kwitnie końcem kwietnia i na początku maja. Roślina owadopylna, zapylienia dokonują głównie trzmiele, również pszczoły. Zakwitą po raz pierwszy po 5-6 latach od wykiełkowania.. Roślina rozmnaża się również wegetatywnie poprzez wytwarzanie cebul potomnych. Występuje zwykle w dużych populacjach po kilka tysięcy osobników – Rys. 2.18. Zwykle tylko 20% stanowią rośliny kwitnące. Liczba chromosomów $2n = 24$.

Siedliskiem są wilgotne, żyzne okresowo zalewane łąki. Wymaga gleb bardzo żyznych, rośnie na czarnoziemach pochodzenia organicznego. Preferowanym odczynem gleby jest odczyn lekko kwaśny – pH 5,6-6,5. Łąki, na których rośnie powinny być koszone raz w roku, po okresie wegetacji. Szachownica kostkowata jest związana z zespołem *Cirsio-Polygonetum bistortae*.

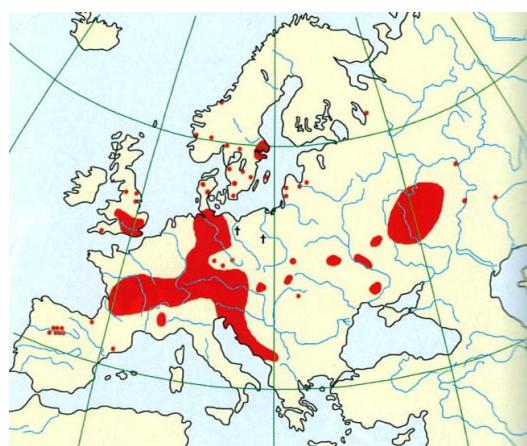


Rys. 2.18. Populacja szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L. w Krównikach

2.2.4. Występowanie

Szachownica kostkowata występuje w środkowej Europie, zachodniej Europie. Zasięg rozciąga się od środkowej Anglii i południowej części półwyspu Skandynawskiego oraz środkowej Rosji (idąc od północy) do południowych Alp i średowo-zachodniej części półwyspu Bałkańskiego na południu. W całym zasięgu swojego występowania pojawia się na stanowiskach rozproszych. Na

Rys. 2.19. przedstawiono zasięg występowania szachownicy kostkowatej na świecie.



Rys. 2.19. Występowanie szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L. na świecie

W Polsce występowanie szachownicy kostkowatej ogranicza się obecnie do terenów łąk nad rzeką Wiar w okolicach Krównik oraz łąk nad rzeką Wisznia w okolicach Stubna oraz Starzawy. Są to obecnie jedyne stanowiska w Polsce, znane już z XIX wieku. W przeszłości szachownica kostkowata występowała również w północno-zachodniej Polsce w okolicach Szczecina i na wyspie Uznam, oraz w środkowej Polsce w okolicach Czarnkowa i Mogilna. Obecnie uważa się że stanowiska w okolicach Czarnkowa i Mogilna miały charakter synantropijny. Stanowiska obecne oraz historyczne na terenie naszego kraju przedstawiono na

Rys. 2.20.



Rys. 2.20. Występowanie szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L. w Polsce

2.2.5. Zagrożenia i ochrona

Według klasyfikacji opublikowanej przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody (IUCN), szachownica kostkowata została zakwalifikowana do kategorii – gatunek krytycznie zagrożony wyginięciem *CR*.

Przyczyną tego, że gatunek jest obecnie krytycznie zagrożony wyginięciem jest przede wszystkim niszczenie jego siedlisk, to jest celowe osuszanie podmokłych łąk, regulacja koryt rzecznych oraz przekształcanie żyznych siedlisk, na których występuje szachownica kostkowata na grunty orne.

Szachownica kostkowata znajduje się w Polsce pod ścisłą ochroną gatunkową. Dla jej ochrony utworzono rezerwaty przyrody w Krównikach i Stubnie. Rezerwat florystyczny „Szachownica w Krównikach” –

Rys. 2.21, został utworzony dnia 1 października 1974 roku, na terenie gminy Przemyśl. Powierzchnia rezerwatu wynosi 16,67 ha. Rezerwat florystyczny „Szachownica Kostkowata w Stubnie” –

Rys. 2.22, został utworzony dnia 15 czerwca 2001 roku, na terenie gminy Stubno. Powierzchnia rezerwatu to 13,63 ha.



Rys. 2.21. Rezerwat florystyczny „Szachownica w Krównikach”. [9]



Rys. 2.22. Rezerwat florystyczny „Szachownica Kostkowata w Stubnie”. [9]

2.3. Ochrona ginących gatunków roślin w Polsce

Ochrona przyrody, w tym roślin ma w Polsce długie tradycje. Już za czasów panowania Władysława Jagiełły, królewską ochroną objęte były cisy – *Taxus baccata* L.

Obecnie ochrona prawna w Polsce opiera się główne o akt prawny jakim jest *ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody* [12]. Dodatkowo w kontekście roślin uzupełnieniem dla ustawy jest *rozporządzenie ministra środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin* [12], która definiuje listę gatunków prawnie chronionych na terenie Polski. Ustawa określa dwa zasadnicze rodzaje ochrony gatunkowej:

- ochronę częściową, która dopuszcza możliwość redukcji liczebności populacji oraz pozyskiwania osobników tych gatunków lub ich części,
- ochronę ścisłą, jako całoroczną ochronę należących do nich osobników i stadiów ich rozwoju.

Podstawową kwestią w ochronie ginących gatunków jest wiedza na temat tego które gatunki są szczególnie narażone na wyginiecie oraz w jakim stopniu. Wiedza na temat gatunków ginących jest zebrana między innymi w postaci Czerwonych List oraz Czerwonych Księg wydawanych przez Instytut Ochrony Przyrody PAN w Krakowie.

Czerwona Lista zawiera tabelaryczny spis taksonów z kategorią zagrożenia dobraną według

Tab. 2.1. wraz z kryterium na podstawie którego przyporządkowano takson do danej kategorii zagrożenia. Ponadto zawarto informacje na temat kategorii zagrożenia danego taksonu w Europie i na Świecie, oraz informacje na temat tego czy dany takson jest chroniony na podstawie Konwencji Berneńskiej lub Dyrektywy Siedliskowej. Na Czerwonej Liście znajdują się wszystkie taksony które mają kategorię inną niż LC.

Tab. 2.1. Kategorie zagrożeń w Czerwonej Liście oraz Czerwonej Księdze.

Symbol kategorii	Nazwa kategorii	
	Nazwa angielska	Nazwa polska
EX	Extinct	takson całkowicie wymarły
EW	Extinct in the Wild	takson wymarły w stanie dzikim
RE	Regionally Extinct	takson wymarły w na obszarze Polski
REW	Regionally Extinct in the Wild	takson wymarły w stanie dzikim na obszarze Polski
CR	Critically Endangered	krytycznie zagrożony
EN	Endangered	zagrożony
VU	Vulnerable	narażony
NT	Near Threatened	bliski zagrożenia
LC	Least Concern	takson najmniejszej uwagi, który

		nie kwalifikuje się do żadnej z wyżej wymienionych kategorii zagrożenia
DD	Data Deficient	takson, którego stopień zagrożenia nie może być określony z powodu braku wystarczających informacji

Czerwona Księga zawiera szczegółowe opisy większości gatunków znajdujących się na Czerwonej Liście. Opisy te zawierają między innymi charakterystykę morfologii wzbogaconej zdjęciami, rozmieszczenia geograficznego wraz z mapami występowania gatunku w Polsce i na Świecie, biologii, siedliska, zagrożenia i formy ochrony. Pełni ona więc również swojego rodzaju atlasu roślin ginących.

Gatunki umieszczone na Czerwonej Liście oraz w Czerwonej Księdze są uwzględniane w rozporządzeniach ministra środowiska dotyczących ochrony gatunkowej roślin. Oba opracowania są aktualizowane i wydawane co kilka lat.

2.3.1. Metody ochrony ginących gatunków roślin

Zachowanie gatunków będących pod ochroną gatunkową czy to częściową czy ścisłą może opierać się na ich ochronie *in-situ*, to jest w miejscu naturalnego występowania tych gatunków oraz *ex-situ* czyli poza miejscem ich naturalnego, pierwotnego występowania.

W przypadku ochrony *in-situ* wyróżnia się następujące formy ochrony (powierzchnia obszarów chronionych według [13], stan na dzień na dzień 14.01.2019):

- Parki Narodowe: obecnie w Polsce istnieją 23 parki narodowe. Najstarszym jest Pieniński Park Narodowy, data utworzenia 1 czerwca 1932 a najmłodszym Park Narodowy „Ujście Warty”, data utworzenia 1 lipca 2001. Łączna powierzchnia parków narodowych w Polsce wynosi 329 490,80 ha.
- Rezerwaty Przyrody: obecnie w Polsce istnieje 1499 rezerwatów przyrody. Najstarszym jest rezerwat „Kępa Redłowska”, data utworzenia 29 lipca 1938, natomiast najmłodszym rezerwat „Mechowisko Manowo”, data utworzenia 13 września 2018 roku. Łączna powierzchnia rezerwatów przyrody w Polsce wynosi 168 669,74 ha.
- Parki Krajobrazowe: obecnie w liczbie 124. Najstarszym jest Suwalski Park Krajobrazowy, utworzony 12 stycznia 1976 roku, a najmłodszym Park Krajobrazowy Góry Łosiowe, utworzony dnia 29 czerwca 2018 roku. Łączna powierzchnia parków krajobrazowych w Polsce wynosi 2 543 339,44 ha.
- Obszary Chronionego Krajobrazu: obecnie w liczbie 406. Najstarszym jest obszar chronionego krajobrazu „Pojezierze Drawskie” utworzony dnia 17 listopada 1975 roku, a najmłodszym Świętokrzyski Obszar Chronionego Krajobrazu utworzony dnia 30 maja 2017 roku. Całkowita powierzchnia obszarów chronionego krajobrazu w Polsce wynosi 7 695 261,62 ha.
- Obszary Natura 2000: obecnie w liczbie 994.

- Pomniki Przyrody: obecnie w liczbie 31 449.
- Stanowiska Dokumentacyjne: w liczbie 179.
- Użytki Ekologiczne: w liczbie 7 661.
- Zespoły Przyrodniczo-Krajobrazowe: w liczbie 352.

Ochrona *in-situ* jest podstawową i najbardziej wskazaną formą ochrony roślin w Polsce, jednakże w przypadku niektórych bardzo rzadkich i ginących, gatunków roślin może się okazać niewystarczająca aby uchronić je przed zniknięciem z krajowej flory. Co więcej nieliczne w przypadku niektórych gatunków stanowiska mogą ulec celowemu bądź spontanicznemu zniszczeniu a wraz z nimi wszyscy znani nam przedstawiciele tegoż gatunku. Stąd dla gatunków ginących konieczna staje się również ochrona *ex-situ*. Ochrona *ex-situ* prowadzona często jest równolegle z ochroną *in-situ*. Osobniki pochodzące z różnych form ochrony *ex-situ* mogą w razie potrzeby być materiałem wyjściowym do reintrodukcji na stanowiskach pierwotnych, stanowią więc swojego rodzaju rezerwuar, zabezpieczenie na przyszłość. Ochrona *ex-situ* może być prowadzona poprzez:

- Metaplantację: to jest przeniesienie części lub całości populacji z pierwotnego, zagrożonego z jakiegoś powodu stanowiska na stanowisko zastępcze, które będzie zgodne pod względem siedliskowym z wymaganiami gatunku.
- Nasienne banki roślin: próbki nasion są przechowywane w miejscu o odpowiednich warunkach klimatycznych, głównie w ciekłym azocie (-135°C lub -196°C), które zapewniają odpowiednią żywotność nasion przez długi czas. W Polsce tego rodzaju bank nasion znajduje się między innymi w Ogrodzie Botanicznym PAN w Powsinie.
- Ogrody botaniczne: populacje o odpowiednim rozmiarze utrzymywane są w specjalnych kolekcjach polowych, na dobranych pod względem siedliskowym poletkach. Kolekcje te tworzą swojego rodzaju polowe banki roślin.
- Banki tkanek *in-vitro*.

2.3.2. Banki tkanek *in-vitro*

Banki tkanek *in-vitro*, są to zbiory roślin prowadzone w kulturach *in-vitro* o spowolnionym wzroście lub zabezpieczone i przechowywane poprzez krioprezerwację w ciekłym azocie. Banki tkanek *in-vitro* są najmłodszą i najbardziej zaawansowaną metodą ochrony *ex-situ*. Metoda ta ma bardzo wiele zalet w porównaniu do konwencjonalnych metod ochrony *ex-situ*. Cechami, o których warto wspomnieć są:

- Niezależność od warunków zewnętrznych, takich jak temperatura, nasłonecznienie, gleba, wilgotność powietrza. Kultury *in-vitro* prowadzone są w warunkach kontrolowanych, co umożliwia utrzymanie warunków optymalnych dla danego taksonu oraz odporność na różnego rodzaju katastrofy pogodowe.
- Odporność na szkodniki i choroby, przynajmniej w późniejszym okresie prowadzenia kultur po uzyskaniu w pełni zdrowego materiału. Kolekcje polowe w ogrodach

botanicznych lub metaplantacja są narażone na zniszczenie przez nagły, masowy pojaw szkodników i chorób.

- Możliwość zgromadzenia dużego banku roślin na stosunkowo niewielkiej powierzchni. Według [14] na półce o powierzchni 2 m² można przechowywać 800 genotypów winorośli, podczas gdy do przechowywania takiej samej liczby genotypów winorośli w postaci kolekcji polowej, wymagana jest powierzchnia około 1 ha.
- Możliwość szybkiego rozmnożenia utrzymywanych w banku roślin. Jest to cecha istotna szczególnie w przypadku gatunków, które wchodzą w fazę generatywną dopiero po kilku, kilkunastu, kilkudziesięciu latach np. drzewa.
- Możliwość masowego rozmnożenia utrzymywanych w banku roślin. Niewielka próbka materiału wyjściowego z banku tkanek *in-vitro* może posłużyć do otrzymania właściwe nieograniczonej ilości materiału docelowego.
- Właściwie nieograniczona żywotność materiału w banku kultur *in-vitro*. Przy rozmnażaniu materiału na własne potrzeby nie ma konieczności odnawiania roślin w banku co kilka/kilkanaście lat, jak ma to miejsce np. w przypadku banku nasion, ze względu na ograniczoną ich żywotność.
- Nieinwazyjność. Do założenia banku wystarczy wegetatywny fragment rośliny, np. liść dzięki czemu nie trzeba niszczyć rośliny wyjściowej. Cechą ta może być szczególnie istotna w przypadku wybitnie rzadkich taksonów, których populacja wynosi kilka, kilkadziesiąt osobników.
- Mobilność zbioru. W razie nagłej potrzeby bank można przenieść do dowolnego miejsca na Świecie.
- Niski koszt utrzymania materiału roślinnego. Według [15] roczny koszt przechowywania jednego drzewa w kolekcji polowej szacuje się na 77\$ podczas gdy w przypadku banku tkanek *in-vitro* w postaci kultur o spowolnionym wzroście koszt ten wynosi 23\$ a przy banku tkanek *in-vitro* w postaci krioprezerwacji 1\$.

W Polsce istnieją co najmniej trzy banki tkanek *in-vitro*. Najstarszy z nich zlokalizowany jest w Ogrodzie Botanicznym PAN w Powsinie. Oprócz tego podobne banki znajdują się w Leńskim Banku Genów w Kostrzycy oraz w Pracowni Zasobów Genowych Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

2.4. Etapy mikrorozmnażania

Mechanizm tworzenia banku tkanek *in-vitro* jest procesem kilkuetapowym i każdy z tych etapów wymaga indywidualnego opracowania dla danego gatunku czy nawet odmiany. Bazą dla obu metod zarówno kultur *in-vitro* o spowolnionym wzroście jak i krioprezerwacji w ciekłym azocie jest opracowanie warunków prowadzenia kultury, tak zwanych protokołów mikrorozmnażania. Protokół mikrorozmnażania obejmuje w wersji podstawowej następujące etapy [16]:

Etap 0: Selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej

Celem tego etapu jest selekcja rośliny matecznej typowej dla danego gatunku czy odmiany oraz skuteczne odkażania materiału matecznego.

Etap I: Inicjacja kultury

Celem tego etapu jest otrzymanie aseptycznej (wolnej od chorobotwórczych drobnoustrojów) kultury, w której następnie kontynuowany jest rozwój i/lub wzrost eksplantatów (wzrost wierzchołka pędu, formowanie kalusa). Po krótkim okresie inkubacji wszystkie kultury, które mają objawy zakażeń na esplanadach lub pożywce powinny być usunięte.

Etap II: Namnażanie

Celem tego etapu jest doprowadzenie do wytworzenia nowych przyrostów rośliny lub diaspor, które po odłączeniu od kultury będą mogły dać początek nowej kompletnej roślinie. Namnażanie to może być wynikiem pobudzenia rozwoju pąków bocznych, wytworzeniem pąków przybyszowych, powstania zarodków somatycznych, lub uzyskania miniaturowych organów spichrzowych. W niektórych metodach mikrorozmnażaniach faza ta obejmuje również poprzedzającą wytworzenie organów przybyszowych fazę (pod fazę) wytworzenia centrów merysystematycznych. Faza namnażania może być powtarzana aż do uzyskania pożądanej liczby materiału roślinnego. Regeneraty na tym etapie są bardzo małe, nie są jeszcze zdolne do samodzielnego odżywiania, węglowodany muszą być dostarczane do regeneratów wraz z pożywką.

Etap III: Rozwój i ukorzenianie regeneratów

Celem tego etapu jest przestawienie regeneratów na autotroficzny tryb odżywiania, ich dalszy rozwój oraz ukorzenienie. Regeneraty po tym etapie powinny być w stanie uzyskiwać węglowodany poprzez proces fotosyntezy. Czasami etap ten dzielony jest na dwa podetapy:

- Etap IIIa: polegający na przyroście, rozwoju regeneratów oraz przestawieniu na autotroficzny tryb odżywiania
- Etap IIIb: polegający na ukorzenieniu regeneratów.

Etap IV: Aklimatyzacja

Celem tego etapu jest uzyskanie regeneratów zdolnych do dalszego rozwoju w warunkach *ex-vitro*. Warunki prowadzenia kultury takie jak temperatura, natężenie oświetlenia, wilgotność powietrza są stopniowo wyrównywane do takich jakie panują w środowisku zewnętrznym dla kultury.

W przypadku pierwszej metody tworzenia banków kultur, to jest kultur *in-vitro* o spowolnionym wzroście dochodzi jeden etap który należy umieścić po etapie namnażania to jest etap kultur o spowolnionym wzroście.

W przypadku drugiej metody to jest krioprezerwacji dochodzi dodatkowo konieczność opracowania optymalnych warunków dla wszystkich etapów procesu krioprezerwacji, który następuje zwykle po etapie namnażania.

Dla wielu gatunków użytkowych oraz coraz większej liczby gatunków ginących opracowano szczegółowe protokoły mikrorozmnażania. Należy jednak pamiętać, że poszczególne protokoły mikrorozmnażania dla tego samego gatunku będą się różnić w zależności od rodzaju metody mikrorozmnażania (kultury merystemów wierzchołkowych, pąków bocznych, pąków przybyszowych, kalusa i inne) czy też rodzaju eksplantatu źródłowego (fragment liścia, kwiatu, łodygi, cebuli). Wciąż zatem istnieje potrzeba stworzenia protokołów dla bardzo wielu gatunków roślin i dopracowania tych które już istnieją. Jest to element niezbędny w skuteczniej ochronie *ex-situ* gatunków ginących metodą banków tkanek *in-vitro*.

2.5. Mikrorozmnażanie *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Dla mikrorozmnażania techniką powstawania pąków przybyszowych bezpośrednio w tkankach eksplantatu (organogenezy bezpośredniej) nie znaleziono badań dotyczących odmiany karpackiej śnieżycy wiosennej – *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, ani też dotyczących całego gatunku śnieżycy wiosennej – *Leucojum vernum* L. Znaleziono natomiast publikacje dotyczące drugiego ze znanych obecnie gatunków rodzaju śnieżycy *Leucojum*, to jest śnieżycy letniej *Leucojum aestivum* L.

Pierwsza z publikacji nosi tytuł „Micropagation of *Leucojum aestivum* L. (Summer Snowflake)” [17]. Autorami tej publikacji są N. Zagorska, M. Stanilova, V. Ilcheva oraz P. Gadeva z Bułgarskiej Akademii Nauk w Sofii. Publikacja znalazła się w książce „Biotechnology in Agriculture and Forestry 40. Hihg-Tech nad Micropagation VI” [18] jako samodzielny rozdział. W tej publikacji znaleziono cenne informacje dotyczące etapów 0, I, II oraz III protokołu mikrorozmnażania śnieżycy letniej.

Druga z publikacji nosi tytuł „*Leucojum aestivum* L. *in vitro* bulb induction and acclimatization” [19]. Jej autorem jest Agata Ptak z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Publikacja została zamieszczona w „Central European Journal of Biology” w 2014 roku. W tej publikacji znaleziono informacje dotyczące III-go i IV-go etapu protokołu mikrorozmnażania śnieżycy letniej.

W kolejnych podrozdziałach omówiono zastosowane w publikacjach metody oraz otrzymane rezultaty dla każdego z etapów mikrorozmnażania. Posłużyły one jako baza do doświadczenia w niniejszej pracy.

2.5.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej

W publikacji [17] już na wstępie zaznaczono, że rośliny z rodziny *Amaryllidaceae* są szczególnie trudne w mikrorozmnażaniu. W przypadku śnieżycy letniej *Leucojum aestivum* L. w przeszłości napotkano na problemy z licznymi zakażeniami w kulturach, których przyczyny dopatrywano się w naturalnych endogenicznych infekcjach. Zauważono, że części rośliny znajdujące się pod powierzchnią gruntu są znacznie bardziej porażane przez patogeny niż części nadziemne. Ponadto w przypadku liści, liście młode były mniej porażane niż liście dojrzałe. Zaczęto więc od poszukiwań metod skutecznego odkażania materiału wyjściowego. Wyszczególniono trzy czynniki, których wpływ na ilość zakażeń w kulturach zbadano:

- Czynnik A: długość okresu pomiędzy zbiorem materiału roślinnego i inokulacją *in vitro*.
- Czynnik B: czas trwania mycia materiału roślinnego pod bieżącą wodą przed odkażaniem.
- Czynnik C: czas trwania ekspozycji na 0,1% roztwór $HgCl_2$ w trakcie odkażania.

Kultury prowadzono cztery tygodnie, w dwóch powtórzeniach dla eksplantatów pochodzących z wierzchołków korzeni, fragmentów cebuli, liści, łodygi nadziemnej, pąków kwiatowych oraz różnych kombinacji wartości trzech wymienionych wyżej czynników. Dla eksplantatów pochodzących z liści określono optymalne wartości trzech wymienionych wyżej czynników, które zapewniły procent niezainfekowanych eksplantatów na poziomie 82,88%. Szczególnie istotny okazał się czynnik A. Wartości te przedstawiają się następująco:

- Czynnik A: 42 dni.
- Czynnik B: 16 godzin.
- Czynnik C: 2 minuty.

Wyników dla fragmentów wierzchołków korzeni, fragmentów cebuli, łodygi nadziemnej, pąków kwiatowych nie zamieszczono w publikacji. W publikacji [17] podano jedynie informację że procent niezainfekowanych eksplantatów był niski.

Sumarycznie według [17] zalecenia dla etapu 0 przed I protokołem mikrorozmnażania metodą organogenezy bezpośredniej (ekspplantaty liściowe) przedstawia się następująco:

1. Kultura powinna być założona po 42 dniach od zbioru materiału roślinnego.
2. Mycie materiału w wodzie z dodatkiem detergentu.
3. Pocięcie liści na 7-8 długich kawałków odpowiednich do powierzchniowego odkażania.
4. Opłukiwanie liści w bieżącej wodzie przez 16 godzin.
5. Zanurzenie w 70% roztworze etanolu C_2H_5OH przez 1 minutę.
6. Zanurzenie w 0,1% roztworze chlorku rtęci (II) $HgCl_2$ przez 2 minuty.

W publikacji [19] nie podano informacji dotyczących etapu 0 mikrorozmnażania.

2.5.2. Etap I – inicjacja kultury

W publikacji [17] do mikrorozmnażania techniką organogenezy bezpośredniej użyto dwóch pożywek oznaczonych symbolami MS1 oraz MS2. Obie pożywki bazują na pożywce Murashigego i Skooga (MS) bez witamin i różnią się pomiędzy sobą zawartością witamin, cukru. W Tab. 2.2 zebrano składy obu pożywek.

Tab. 2.2. Skład pożywek MS1 oraz MS2.

Makroelementy [mg/l]		
Nazwa związku	MS1 i MS2	
NH_4NO_3	1650,000	
KNO_3	1900,000	
CaCl_2	332,020	
MgSO_4	180,540	
KH_2PO_4	170,000	
Mikroelementy [mg/l]		
Nazwa związku	MS1 i MS2	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	
FeNaEDTA	36,700	
KI	0,830	
H_3BO_3	6,300	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Witaminy [mg/l]		
Nazwa związku	MS1	MS2
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5	
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5	
tiamina (witamina B ₁)	0,5	
kwas askorbinowy (witamina C)	0,1	-
Regulatory wzrostu [mg/l]		
Nazwa związku	MS1 i MS2	Grupa
NAA	1,0	auksyny
kinetyna	1,0	cytokininy
BAP	1,0	cytokininy

Pozostałe związki [g/l]		
Nazwa związku	MS1	MS2
agar		7,0
sacharoza	45,0	30,0
Cechy pożywki		
Cecha	MS1 i MS2	
rodzaj pożywki	stała	
pH	5,8	

Eksplantatami w etapie I, były 0,5-1,0 cm fragmenty ułożone poziomo na powierzchni pożywki.

Fizyczne warunki prowadzenia kultur w publikacji [17] kształtowały się następująco:

- temperatura: 21 °C,
- długość dnia: 16 h,
- natężenie oświetlenia: 1500 lx.

Kultury było prowadzone okres 4-5 tygodni. Prowadzono kultury dla eksplantatów pochodzących z wierzchołków korzeni, fragmentów cebuli, liści, łodygi nadziemnej, pąków kwiatowych. W przypadku eksplantatów pochodzących z liści dokonano dalszego podziału rodzajów eksplantatów na te pochodzące z pochew liściowych, z wierzchołków liści oraz z młodych liści. W publikacji [17] przedstawiono wyniki jedynie dla liści (z wariantami) oraz fragmentów cebul. Wyniki z publikacji zebrano w Tab. 2.3.

Tab. 2.3. Wyniki doświadczenia po I etapie z publikacji [17].

Rodzaj eksplantatu	Liczba wyłożonych eksplantatów	Liczba eksplantatów z regeneratami	Calkowita liczba otrzymanych regeneratów
	[szt]	[szt]	[szt]
Pochwa liściowa	218	77	323
Wierzchołek liścia	287	3	5
Młode liście	108	51	208
Fragmenty cebuli	347	36	98

Uzyskane w publikacji [17] wyniki będą punktem odniesienia dla wyników otrzymanych w doświadczeniu będącym tematem pracy. Ich analiza oraz porównanie znajduje się w rozdziale piątym niniejszej pracy.

2.5.3. Etap II – namnażanie

W publikacji [17] oraz [19] nie ma wzmianki o etapie namnażania, etap ten został najpewniej pominięty, regeneraty z I etapu były otrzymywane w liczbie wystarczającej aby przejść do etapu III.

2.5.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów

W publikacji [17] korzenie na regeneratach pojawiały się spontanicznie lub po przełożeniu na pożywkę do ukorzeniania. Skład pożywki do ukorzeniania przedstawiono w Tab. 2.4. Pożywka bazowała na pożywce MS2 z zmniejszoną zawartością hormonów, cukru i agaru.

Tab. 2.4. Skład pożywki wykorzystanej do ukorzeniania regeneratów. [17]

Makroelementy		
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]	
NH_4NO_3	1650,000	
KNO_3	1900,000	
CaCl_2	332,020	
MgSO_4	180,540	
KH_2PO_4	170,000	
Mikroelementy		
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	
FeNaEDTA	36,700	
KI	0,830	
H_3BO_3	6,300	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Witaminy		
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]	
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5	
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5	
tiamina (witamina B ₁)	0,5	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]	Grupa

NAA	0,1	auksyny
kinetyna	0,1	cytokininy
BAP	0,1	cytokininy
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość substancji [g/l]	
agar	5,0	
sacharoza	15,0	
Cechy pożywki		
rodzaj pożywki	stała	
pH	5,8	

Dodatkowo w etapie III zmianie uległy warunki fizyczne prowadzenia kultur. Przez pierwszych 4-6 tygodni obniżono temperaturę do 5°C. Wynikiem było uzyskanie korzeni na 85% regeneratów. Pozostałe warunki fizyczne prowadzenia kultur nie uległy zmianie.

W publikacji [17] zauważono, że regeneraty zachowały okres uśpienia w czasie charakterystycznym dla śnieżycy letniej – od lipca do października. Eksplantaty w tym okresie miały zahamowany wzrost. Wzrost był ponownie podejmowany dopiero w październiku, nawet w przypadku eksperymentów zakładanych na koniec czerwca. Próby przełamania okresu uśpienia za pomocą ciemności oraz niskiej temperatury nie odniosły pozytywnego skutku. Po ukorzenieniu kultury prowadzono w temperaturze 21°C przez okres 5-6 miesięcy przez okres aktywności fizjologicznej śnieżycy letniej.

W publikacji [19] główny nacisk w etapie III mikrorozmnażania położono na indukcję cebul w regeneratach. Regeneraty w doświadczeniu opisany w publikacji otrzymano na drodze somatycznej embriogenezy. Regeneraty przełożono na pożywkę Murashigego i Skooga (MS) z witaminami z kilkoma wariantami regulatorów wzrostu oraz zawartością cukru – Tab. 2.5 oraz Tab. 2.6.

Tab. 2.5. Skład pożywek MS30, MS60, MS90 użytych w III etapie mikrorozmnażania w doświadczeniu z [19]

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
CaCl_2	332,020
MgSO_4	180,540
KH_2PO_4	170,000
Mikroelementy	

Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025		
FeNaEDTA	36,700		
KI	0,830		
H ₃ BO ₃	6,300		
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,900		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250		
Witaminy			
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]		
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5		
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5		
tiamina (witamina B ₁)	0,1		
glicyna	2,0		
inozytol (witamina B ₈)	100,0		
Pozostałe związki			
Nazwa związku	Ilość substancji [g/l]		
	MS30	MS60	MS90
agar	6,0		
sacharoza	30,0	60,0	90,0
Cechy pożywki			
rodzaj pożywki	stała		
pH	5,8		

Tab. 2.6. Skład pożywek MSP, MSA, MSG użytych w III etapie mikrorozmnażania w doświadczeniu z [19]

Makroelementy				
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]			
NH_4NO_3	1650,000			
KNO_3	1900,000			
CaCl_2	332,020			
MgSO_4	180,540			
KH_2PO_4	170,000			
Mikroelementy				
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]			
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025			
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025			
FeNaEDTA	36,700			
KI	0,830			
H_3BO_3	6,300			
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600			
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250			
Witaminy				
Nazwa związku	Ilość substancji [mg/l]			
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5			
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5			
tiamina (witamina B ₁)	0,1			
glicyna	2,0			
inozytol (witamina B ₈)	100,0			
Regulatory wzrostu				
Nazwa związku	Grupa	Ilość substancji [mg/l]		
		MSP	MSA	MSG
paklobutrazol	antygibereliny	2,9	–	–
ancymidol	antygibereliny	–	2,6	–
GA ₃	gibereliny	–	–	3,5
Pozostałe związki				
Nazwa związku	Ilość substancji [g/l]			

agar	6,0
sacharoza	30,0
Cechy pożywki	
rodzaj pożywki	stała
pH	5,8

Użyto łącznie sześciu wariantów pożywek. Trzy z nich różnią się pomiędzy sobą zawartością cukru: MS30, MS60, MS90. Kolejne trzy rodzaje zastosowanego regulatora wzrostu: MSP, MSA, MSG. Czas prowadzenia kultur w etapie III to trzy miesiące. Warunki fizyczne prowadzenia kultur w [19] przedstawiały się następująco:

- Temperatura: 25 ± 2 °C.
- Długość dnia: 16 h.
- Natężenie oświetlenia: 6660 lx ($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Po trzech miesiącach prowadzenia kultur obniżono temperaturę do 5°C. Doświadczenie przeprowadzono w pięciu powtórzeniach po 25 roślin na każde powtórzenie.

Najwięcej cebul zawiązały regeneraty prowadzone na pożywkach MSP – 99,3% i MSA – 91,0%. Najmniejsza ilość cebul została zawiązana na regeneratach prowadzonych na pożywce MS30 – 49,5%. Najcięższe cebule zostały zawiązane na pożywce MS90 – 249,9 mg oraz MSP – 208,6 mg. Najmniejszą masę miały cebule zawiązane na pożywce MS30 – 112,0 mg. Najkorzystniejsza pod kątem formowania cebul wydaje się więc pożywka MSP. Najwięcej ukorzenionych regeneratów uzyskano na pożywce MSP – 45,3%. Najmniej na pożywce MS90 – 9,3%.

2.5.5. Etap IV – aklimatyzacja

W publikacji [17] nie podano szczegółów dotyczących etapu aklimatyzacji. W publikacji [19] opisano sposób aklimatyzacji oraz określono wpływ pożywki z III etapu na ilość mikroroślinek, które przetrwały etap aklimatyzacji w warunkach *ex-vitro*.

Na początku procesu aklimatyzacji roślinki uzyskane z III etapu zostały delikatnie wymyte z pożywki, martwa tkanka została usunięta. Roślinki umieszczone w doniczkach torfowych „Jiffy pot” i umieszczone pod folią. Proces aklimatyzacji trwał 5 miesięcy. Warunki fizyczne podczas procesu aklimatyzacji przedstawiały się następująco:

- Temperatura: 25 ± 2 °C.
- Długość dnia: 16 h.
- Natężenie oświetlenia: 6660 lx ($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Największym procentem roślinek, które przetrwały etap aklimatyzacji odznaczały się te prowadzone w III etapie na pożywkach MSP, MS90, MSA. Najmniejszym natomiast te prowadzone na pożywce MS30.

2.6. Mikrorozmnażanie *Fritillaria meleagris* L.

Dla mikrorozmnażania techniką powstawania pąków przybyszowych bezpośrednio w tkankach eksplantatu (organogenezy bezpośredniej) gatunku *Fritillaria meleagris* L. znaleziono kilka publikacji. Nie wyczerpały one tematu, jednak dały dobrą podstawę do doświadczenia.

Pierwsza z publikacji nosi tytuł „Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of *Fritillaria meleagris* in bulb scale culture”. [20] Autorami tej publikacji są Marija Petrić, Slađana Jevremović, Milana Trifunović, Vojin Tadić, Snežana Milošević, Angelina Subotić z Uniwersytetu Belgradzkiego w Serbi. Publikacja została zamieszczona w Turkish Journal of Biology. W tej publikacji znaleziono cenne informacje dotyczące etapu I a w szczególności zaczerpnięto skład pożywki odpowiedniej dla organogenezy bezpośredniej dla eksplantów pochodzących od łusek spichrzowych.

Druga z publikacji nosi tytuł „In Vitro Propagation and Conservation of Rare Species *Fritillaria meleagris* L. from Floral Explants” [21]. Jej autorami są D. S. Muraseva, T. I. Novikova, and A. A. Erst z Rosyjskiej Akademii Nauk w Nowosybirsku. Publikacja została zamieszczona w „Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal” w 2016 roku. W tej publikacji znaleziono informacje dotyczące organogenezy bezpośredniej dla eksplantów pochodzących z kwiatów oraz cenne informacje dla etapów 0, I, II, III oraz IV.

Ostatnia z wykorzystanych publikacji nosi tytuł „Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture in vitro” [22]. Jej autorami są Marija Nikolić, Danijela Mišić, V. Maksimović, Slađana Jevremović, Milana Trifunović, and Angelina Subotić z Instytutu "Siniša Stanković" w Belgradzie. W publikacji znaleziono przede wszystkim informacje dotyczące etapów III oraz IV oraz potwierdzono skład pożywki dla I etapu z [20]. W pracy nie podano szczegółów dotyczących rodzaju eksplantatu początkowego.

W kolejnych podrozdziałach omówiono zastosowane w publikacjach metody oraz otrzymane rezultaty dla każdego z etapów mikrorozmnażania. Posłużyły one jako baza do doświadczenia w niniejszej pracy.

2.6.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej

W publikacji [21] zawarto procedurę odkażania pąków kwiatowych. Przedstawiała się ona następująco:

1. Zanurzenie w 20% roztworze wodnym Domestosu (substancja aktywna: podchloryn sodu NaClO) na czas 20 minut,
2. 3 krotne przemycie w wodzie destylowanej.

W publikacjach [20] oraz [22] nie zawarto informacji dotyczących metod odkażania czy całego etapu 0.

2.6.2. Etap I – inicjacja kultury

W publikacji [20] do mikrorozmnażania techniką organogenezy bezpośredniej dla eksplantatów pochodzących z wewnętrznych łusek cebulowych użyto pożywki bazującej na pożywce Murashigego i Skooga (MS) wzbogaconą L-proliną oraz hydrolizatem kazeiny w dawce 250 [mg/l] oraz regulatorem wzrostu – TDZ w dawce 1 [mg/l]. Dodatkowo w skład pożywki weszła sacharoza 3,0% oraz agar 0,7%. Kompletny skład pożywki przedstawiono w Tab. 2.7.

Warunki prowadzenia kultur w publikacji kształtowały się w publikacji [20] następująco:

- temperatura: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- długość dnia: 16 h,
- natężenie oświetlenia: $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tab. 2.7. Skład pożywki na bazie MS wykorzystanej do pierwszego etapu w publikacji [20].

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
CaCl_2	332,020
MgSO_4	180,540
KH_2PO_4	170,000

Mikroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
FeNaEDTA	36,700
KI	0,830
H_3BO_3	6,300

MnSO ₄ ·H ₂ O	16,900	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250	
Białka		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
L-prolina	250,0	
hydrolizat kazeiny	250,0	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
TDZ	1,0	cytokininy
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [g/l]	
agar	7,0	
sacharoza	30,0	
Cechy pożywki		
Cecha	Wartość	
rodzaj pożywki	stała	
pH	5,8	

W publikacji [21] do mikrorozmnażania techniką organogenezy bezpośredniej dla eksplantatów pochodzących z pąków kwiatowych użyto pożywki na bazie Gamborg and Eveleigh (B5) wzbogaconej o regulatory wzrostu 0,44 [μM] 6-benzyloaminopuryny BAP, 3,22 [μM] kwasu naftylo-1-octowego NAA oraz 2,28 [μM] kwasu indolilo-3-octowego IAA. Przeliczając na [mg/l] byłoby to:

- Dla BAP: $\frac{0,44 [M] \times 10^{-6} \times 225,23 [g]}{1 [M]} = 99,10 [\mu g] \sim 0,01 [mg]$
- Dla IAA: $\frac{3,22 [M] \times 10^{-6} \times 175,18 [g]}{1 [M]} = 564,08 [\mu g] \sim 0,56 [mg]$
- Dla NAA: $\frac{2,28 [M] \times 10^{-6} \times 186,07 [g]}{1 [M]} = 424,24 [\mu g] \sim 0,42 [mg]$

Ilość agaru oraz pH pożywki nie zostały podane w publikacji. Znane składniki pożywki zestawiono w Tab. 2.8. Warunki prowadzenia kultur nie zostały podane w publikacji. Pąki kwiatowe rozpropagowano, oddzielono działki okwiatu od dna kwiatowego. To właśnie działki okwiatu posłużyły jako źródło eksplantatów. W publikacji [22] do etapu pierwszego użyto tej samej pożywki co w publikacji [20].

Tab. 2.8. Skład pożywki na bazie B5 wykorzystanej do pierwszego etapu w publikacji [21].

Makroelementy

Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,000	
KNO_3	2500,000	
CaCl_2	113,230	
MgSO_4	121,560	
NaH_2PO_4	130,440	
Mikroelementy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	
FeNaEDTA	36,700	
KI	0,750	
H_3BO_3	3,000	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,000	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
BAP	0,01	cytokininy
IAA	0,56	auksyny
NAA	0,42	auksyny
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [g/l]	
agar	?	
Cechy pożywki		
Cecha	Wartość	
rodzaj pożywki	stała	
pH	?	

2.6.3. Etap II – namnażanie

Etap II został opisany jedynie w publikacji [21]. Podano nieprecyzyjne informacje odnośnie pożywki – użyto pożywki B5 oraz BDS z dodatkiem regulatorów wzrostu (BAP, IAA oraz NAA) w stężeniu od 0.2–10.0 μM .

Warunki prowadzenia kultur w publikacji kształtoły się w publikacji [20] następująco:

- temperatura: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- długość dnia: 16 h,

okres pomiędzy kolejnymi pasażami wyniósł od 35 do 40 dni.

2.6.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów

W publikacji [20] nie podano informacji dotyczących III etapu. W publikacji [21] podano skład użytej pożywki oraz informacje dotyczące warunków prowadzenia kultury. Użyta pożywka bazowała na pożywce B5 z zredukowaną o połowę zawartością makro- oraz mikroelementów z dodatkiem węgla aktywnego w ilości 0,5 [mg/L] oraz regulatora wzrostu w postaci NAA w ilości 5 [μM] co daje na litr pożywki:

$$\frac{5,00 \text{ [M]} \times 10^{-6} \times 186,07 \text{ [g]}}{1 \text{ [M]}} = 930,35 \text{ [\mu g]} \sim 0,93 \text{ [mg]}$$

Nie podano informacji co do zawartości agaru oraz wartości pH pożywki. Znane składniki pożywki zestawiono w Tab. 2.9.

Informacjami związanymi z warunkami prowadzenia kultury podanymi w publikacji są temperatura, wynosząca 7°C oraz czas prowadzenia kultury to jest 1,5-2,0 miesięcy.

Tab. 2.9. Skład pożywki na bazie pożywki B5 wykorzystanej do trzeciego etapu w publikacji [21].

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	67,000
KNO_3	1250,000
CaCl_2	56,615
MgSO_4	60,780
NaH_2PO_4	65,220
Mikroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,013
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,013
FeNaEDTA	18,350
KI	0,375
H_3BO_3	1,500
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,000
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,013

Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
NAA	0,93	auksyny
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
agar		?
węgiel aktywny		0,5
Cechy pożywki		
Cecha	Wartość	
rodzaj pożywki	stała	
pH	?	

W publikacji [22] do etapu trzeciego użyto pożywki MS bez dodatku hormonów wzrostu. Skład pożywki przedstawiono w Tab. 2.10. Ilości użytego agaru oraz wartości pH nie podano w publikacji. Kultury były prowadzone przez sześć tygodni w następujących warunkach:

- temperatura: 25°C,
- długość dnia: 16 h,
- natężenie oświetlenia: 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Po tym okresie obniżono temperaturę do 4°C i prowadzono kultury przez kolejne sześć tygodni.

Tab. 2.10. Skład pożywki na bazie MS wykorzystanej do trzeciego etapu w publikacji [22].

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
CaCl_2	332,020
MgSO_4	180,540
KH_2PO_4	170,000
Mikroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
FeNaEDTA	36,700
KI	0,830
H_3BO_3	6,300
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
Pozostałe związki	
Nazwa związku	Ilość [g/l]
agar	?
Cechy pożywki	
Cecha	Wartość
rodzaj pożywki	stała
pH	?

2.6.5. Etap IV – aklimatyzacja

W publikacji [20] nie podano szczegółów dotyczących etapu aklimatyzacji. W publikacji [21] opisano sposób aklimatyzacji. Aklimatyzacja przebiegła w zamkniętych pojemnikach z podłożem, które składało się z rozdrobnionego włókna kokosowego i piasku w stosunku 3:1. W publikacji [22] aklimatyzacja przebiegała w doniczkach w warunkach szklarniowych. Więcej szczegółów nie podano.

3. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

W przypadku obu gatunków materiał roślinny został pobrany z środowiska naturalnego. Jak w wspomniano w rozdziale drugim, oba gatunki znajdują się pod ochroną prawną na terenie Polski stąd do pobrania roślin wymagana jest zgoda Generalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska. Ze względu na fakt, że stanowiska obu gatunków znajdują się na terenie jednego województwa – podkarpackiego, wystarczająca była w tym wypadku zgoda Regionalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska w Rzeszowie.

Dnia 22 stycznia 2018 roku złożono do Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Rzeszowie urzędującego przy al. Józefa Piłsudskiego 38, wniosek o wydanie zezwolenia Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska na odstępstwa od zakazów w stosunku do gatunków dziko występujących roślin objętych ochroną. Dnia 9 lutego uzyskano zgodę na odstępstwo od zakazów obowiązujących. Wniosek jak i uzyskaną zgodę dołączono jako Załącznik 1 do niniejszej pracy.

3.1. Śnieżyca karpacka *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

W przypadku śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet wykonano badanie protokołu mikrorozmnażania metodą organogenezy bezpośredniej dla roślin pobranych z środowiska naturalnego oraz zbadano żywotność pyłku pochodzącego od zebranych roślin. Rośliny mateczne pobrano jednokrotnie 23 lutego 2018 roku, natomiast kultury zakładano w IV turach w około tygodniowych odstępach pomiędzy każdą, to jest 09 marca, 16 marca, 23 marca, 06 kwietnia 2018 roku.

3.1.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej

3.1.1.1. Pobranie roślin matecznych z środowiska naturalnego

Śnieżycę karpacką *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet pobrano dnia 23 lutego 2018 roku z rezerwatu florystycznego „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku” – Rys. 2.10,

Rys. 3.1. Rośliny znajdowały się pod około 20 cm warstwą śniegu. Po usunięciu śniegu na powierzchni gruntu widoczne były około 2-3 cm odcinki liści –

Rys. 3.2. Wydobyto 20 całych roślin za pomocą ręcznej łyżki. Rośliny pobrano z różnych miejsc na stanowisku, tak aby nie przetrzebić jednego miejsca. Rośliny przetransportowano do Przemyśla – miejsca zamieszkania autora pracy, gdzie przesadzono je do doniczek z ziemią uniwersalną. Rośliny były przechowywane na klatce schodowej gdzie panowała temperatura około 10 °C. Ze względu na zbyt wysoką temperaturę rośliny podjęły wzrost.



Rys. 3.1. Rezerwat „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku”



Rys. 3.2. *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet pod warstwą śniegu w lutym

Dnia 2 marca 2018 roku przetransportowano pobrane rośliny do wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Były one tam przechowywane w

warunkach 17 °C. Dnia 16 marca 2018, a wiec w momencie kiedy zakładano pierwsze kultury rośliny miały już w pełni rozwinięte liście –

Rys. 3.3, w momencie kiedy zakładano ostatnie kultury 04 kwietnia rośliny były już w pełni kwitnienia –

Rys. 3.4.



Rys. 3.3. Pobrane osobniki śnieżycy karpackiej dnia 16.03.2018



Rys. 3.4. Pobrane osobniki śnieżycy karpackiej dnia 06.04.2018

3.1.1.2. Izolacja materiału roślinnego z rośliny matecznej

Rośliny wyjęto z doniczki oczyszczono z podłoża pod bieżącą wodą. Oddzielono część nadziemną od cebuli. Z części nadziemnej odrzucono pęd kwiatostanowy oraz pożółkłe liście. Liście o najlepszym turgorze zostały wybrane jako baza do założenia kultury. Z liści tych usunięto pochwę liściową pocięto na fragmenty i ponownie przemyto bieżącą wodą, następnie umieszczone w zlewce z wodą. Z części podziemnej rośliny usunięto korzenie za pomocą noża, uważając aby nie zniszczyć piętek, następnie usunięto zewnętrzne suche łuski cebulowe oraz pierwszą warstwę łusek mięsistych. Cebule przemyto pod bieżącą wodą następnie umieszczone w zlewce z wodą. Część nadziemna jak i podziemna przygotowana do odkażania przedstawiona jest na

Rys. 3.5 oraz

Rys. 3.6.



Rys. 3.5. Część nadziemna oraz podziemna przygotowana do odkażania



Rys. 3.6. Część nadziemna oraz podziemna przygotowana do odkażania

3.1.1.3. Odkażanie

Początkowo (w pierwszej turze, to jest 09 marca 2018) odkażanie przeprowadzono według następującej procedury:

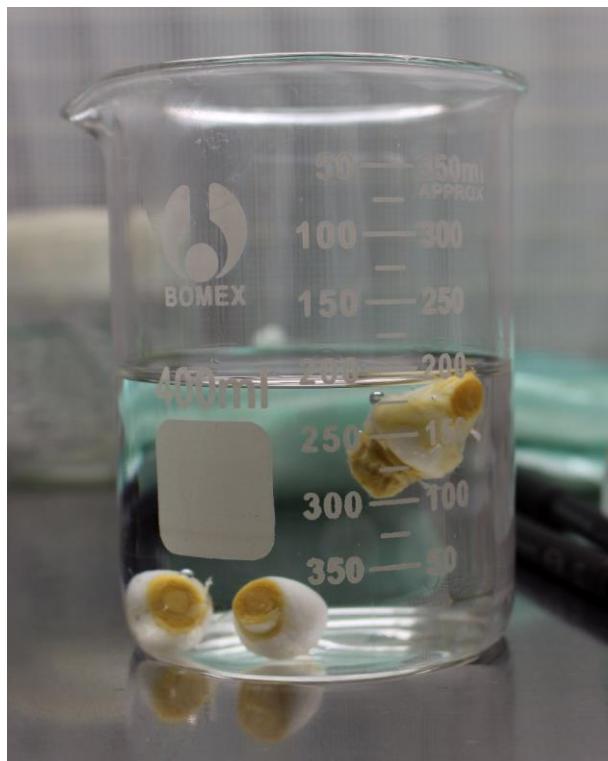
- usunięto wodę ze zlewek a w jej miejsce wlano 70% roztwór wodny etanolu (C_2H_5OH),
- rozpoczęto ręczne mieszanie przez czas 1 minuty,
- usunięto roztwór etanolu a w jego miejsce dodano 20 % roztwór wodny chloraminy (NH_2Cl). Wieczko zlewek okryto folią aluminiową,
- rozpoczęto mieszanie na wytrząsarce WL-972 przez czas 20 minut – Rys. 3.7
- po tym czasie przeniesiono zleweki pod działającą komorę laminarną
- roztwór chloraminy usunięto do zbiorczej zleweki i rozpoczęto proces płukania w wodzie destylowanej. Do zlewek z materiałem roślinnym oddano wody destylowanej na czas 5 minut
- następnie wodę destylowaną z zlewek z materiałem roślinnym zlano do zleweki zbiorczej i zastąpiono ją świeżą wodą destylowaną na czas 5 minut
- czynność z powyższego punktu powtórzono,
- następnie wodę destylowaną z zlewek z materiałem roślinnym zlano do zleweki zbiorczej i zastąpiono ją świeżą wodą destylowaną w której cały materiał roślinny pozostał już do czasu wyłożenia na pożywkę



Rys. 3.7. Wytrząsanie materiału roślinnego z roztworem chloraminy na wytrząsarce WL-972

Ze względu na dużą ilość zakażeń otrzymanych w etapie I mikrorozmnażania, w kolejnych turach zmodyfikowano lekko procedurę odkażania, wydłużając punkt 4 (mieszanie na wytrząsarce WL-972 przez czas 20 minut) z 20 do 25 minut.

Co więcej ze względu na ilość zakażeń, które pojawiły się na esplanadach łuskowych, zdecydowano się na dodatkowy eksperyment. W przypadku kilku kultur a dokładniej ŚK/Ł/1 oraz ŚK/Ł/2 założonych 23 marca 2019 oraz ŚK/Ł/1 oraz ŚK/Ł/2 założonych 06 kwietnia 2018 zmodyfikowano sposób odkażania eksplantatów łuskowych. Zamiast odkażać całe cebule i izolować łuski z już odkażonych cebul, zdecydowano się wyizolować łuski jeszcze przed odkażaniem. Dzięki temu, każda z łusek z której zostały wykonane eksplantaty miała bezpośredni kontakt z czynnikami odkażającymi. Efekt tego eksperymentu został omówiony w rozdziale 4.1.5.



Rys. 3.8. Odkażony i wypłukany materiał roślinny po etapie 0 – cebule

Odkażony oraz wypłukany materiał roślinny *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet przedstawiono na

Rys. 3.8 oraz

Rys. 3.9. Materiał znajduje się w zlewkach w wodzie destylowanej w działającej komorze laminarnej. Na materiale widać uszkodzenia tkanek (zabrązowienia) spowodowane działaniem środków odkażających. Krok ten kończy etap 0 mikrorozmnażania *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.



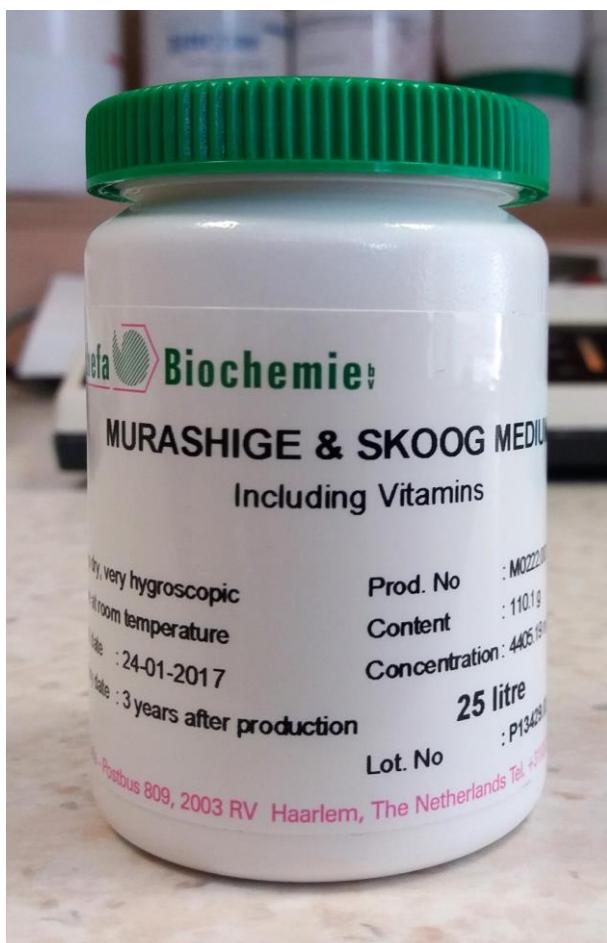
Rys. 3.9. Odkążony i wypłukany materiał roślinny po etapie 0 – liście

3.1.2. Etap I – inicjacja kultury

Jak już wspomniano, kultury *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet zakładano w czterech turach 9 marca, 16 marca, 23 marca, 6 kwietnia 2018 roku. Dodatkowo 16 kwietnia oraz 20 kwietnia 2018 roku założono kilka kultur ratunkowych pochodzących z zakażonych szalek założonych w wcześniejszym etapie.

3.1.2.1. Skład pożywek

W doświadczeniu jako bazowej pożywki użyto pożywki stałej MS2 z publikacji [17] z tą modyfikacją, że zamiast witamin określonych w MS2 w publikacji [17] użyto „pełnych” witamin z pożywki MS. Jako baza posłużyła pożywka „Murashige & Skoog Medium Including Vitamins” firmy „Duchefa Biochemie” – Rys. 3.10. Jej jest dostępny jako Załącznik 2 do pracy lub na stronie producenta [23].



Rys. 3.10. Pożywka firmy Duchefa Biochemie wykorzystana jako baza w doświadczeniu

Kompletny skład pożywki wykorzystanej w etapie I mikrorozmnażania *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet przedstawiono w Tab. 3.1. Po I turze zakładania kultur, ze względu na dużą ilość zakażeń, zdecydowano rozszerzyć skład pożywki o antybiotyk cefotaksym w ilości 25 [ml/l].

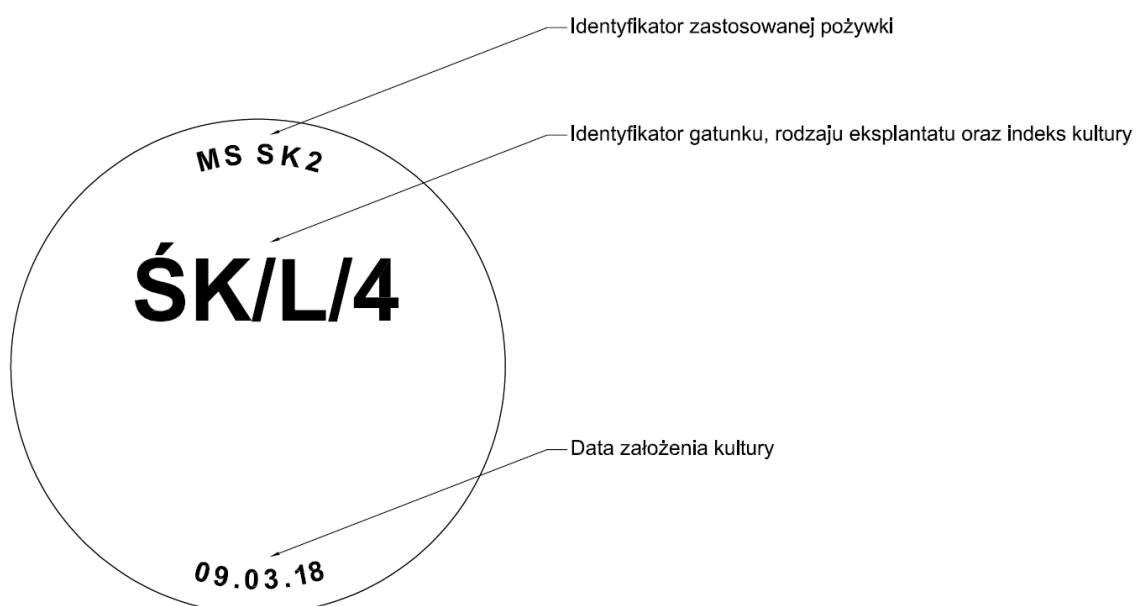
Tab. 3.1. Skład pożywki wykorzystanej do pierwszego etapu mikrorozmnażania.

Makroelementy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
NH_4NO_3	1650,000	
KNO_3	1900,000	
CaCl_2	332,020	
MgSO_4	180,540	
KH_2PO_4	170,000	
Mikroelementy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	
FeNaEDTA	36,700	
KI	0,830	
H_3BO_3	6,300	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Witaminy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
tiamina (witamina B ₁)	0,1	
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5	
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5	
inozytol (witamina B ₈)	100,0	
glicyna	2,0	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
NAA	1,0	auksyny
kinetyna	1,0	cytokininy
BAP	1,0	cytokininy
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [g/l]	
agar	7,0	
sacharoza	30,0	

Cechy pożywki	
Cecha	Wartość
rodzaj pożywki	stała
pH	5,8

3.1.2.2. Opis kultur

Kultury zakładano w szalkach Petriego wykonanych z tworzywa sztucznego. Każda z szalek była opisana za pomocą identyfikatorów przedstawionych na Rys. 3.11. Nie mieszano różnych rodzajów eksplantatów czy też gatunków w pojedynczej szalce.



Rys. 3.11. Sposób opisywania szalek Petriego z *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Każda kultura posiadała identyfikator zastosowanej pożywki umieszczony w górnej części wieczka szalki. Dla śnieżycy karpackiej użyto w doświadczeniu dwóch rodzajów pożywek 'MS SK2' oraz 'MS SK2+Cf'. Poprzez oznaczenie 'MS SK2' należy rozumieć pożywkę na bazie MS2 dla śnieżycy karpackiej (skład z tab.3.1). Natomiast poprzez 'MS SK2+CF' należy rozumieć pożywkę o takim samym składzie jak 'MS SK2', z dodatkiem antybiotyku cefotaksym w dawce 25 [ml/l]. Samo oznaczenie było nanoszone na szalkę w momencie rozlewania pożywki do szalek Petriego, jeszcze przed wyłożeniem eksplantatów, pomagało więc również uniknąć pomyłki z pożywką przeznaczoną dla *Fritillaria meleagris* L.

Kolejnym oznaczeniem był identyfikator gatunku, rodzaju eksplantatu oraz indeks kultury. Oznaczenie to znajdowało się w centralnej części szalki. Kolejne identyfikatory były oddzielone ukośnikiem. Pierwszy identyfikator to identyfikator gatunku, dla szalek zawierających eksplantaty pochodzące od *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet jego wartość to 'ŚK'. Drugi identyfikator to identyfikator rodzaju eksplantatu. Dla śnieżycy karpackiej przyjmował on w pracy następujące wartości:

- 'L' – kiedy eksplantat pochodził z liścia
- 'Ł' – kiedy eksplantat pochodził z łuski wewnętrznej cebuli
- 'P' – kiedy eksplantat pochodził z piętki (skróconej łodygi u cebulowych)

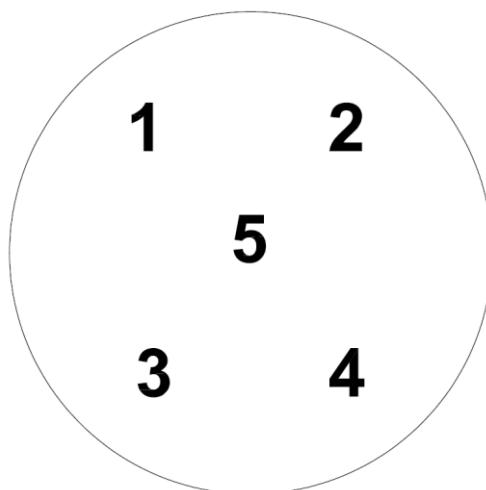
Trzecim identyfikatorem jest indeks kultury, numeracja zaczyna się od 1, jest specyficzna dla danego rodzaju eksplantatu oraz daty założenia kultury.

Ostatnim oznaczeniem na szalce była data założenia kultury. Informacja ta, znajdowała się w dolnej części wieczka.

3.1.2.3. Sposób przygotowania oraz wykładania eksplantatów

Wszystkie czynności były wykonywane w działającej komorze laminarnej. W każdej szalce umieszczono pięć eksplantatów. Ułożenie eksplantatów na szlace wraz z ich numeracją zostało przedstawione na

Rys. 3.12. Po umieszczeniu wszystkich eksplantatów na pożywce, brzegi szalek zostały zabezpieczone za pomocą gumowych pasków.



Rys. 3.12. Numeracja eksplantatów na szlacie

Eksplantatem liściowym był środkowy fragment liścia o długości około 0,5-1,0 [cm]. Brzegi liścia zostały odcięte. Cztery eksplantaty w każdej szalce były umieszczone horyzontalnie na powierzchni pożywki, natomiast jeden o indeksie '5' wertykalnie.

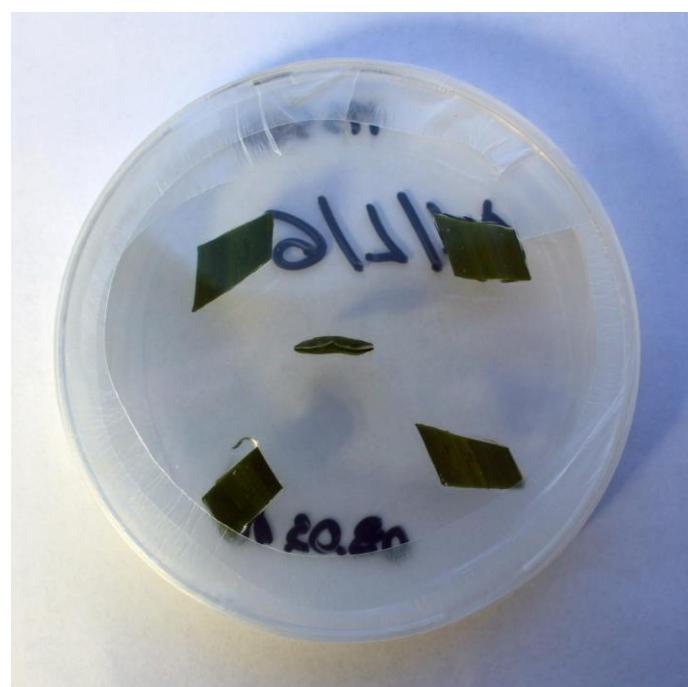


Rys. 3.13. Awers szalki z eksplantatami liściowymi nieetiolowanymi
W przypadku eksplantatów liściowych, oddzielnie wykonywano szalki z eksplantatami
pochodzącymi od liści nieetiolowanych –

Rys. 3.13 oraz
Rys. 3.14 jak i etiolowanymi (liście wewnętrzne) –

Rys. 3.15 oraz

Rys. 3.16.



Rys. 3.14. Rewers szalki z eksplantatami liściowymi nieetiolowanymi



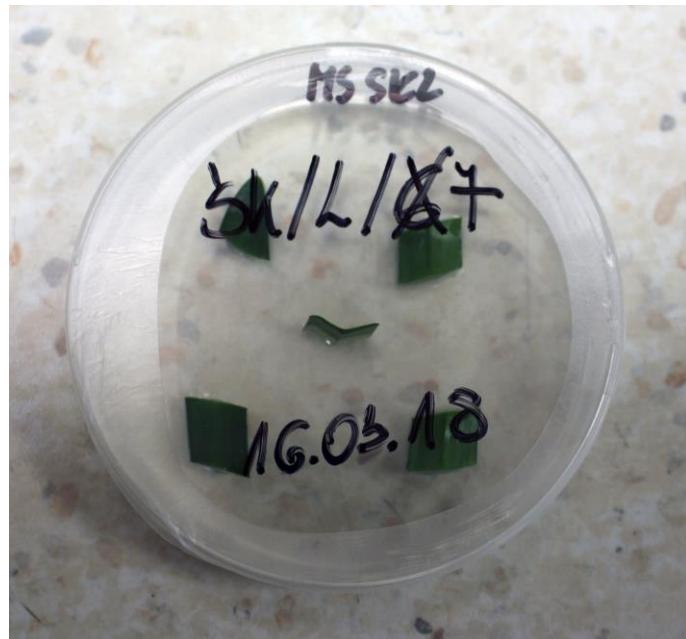
Rys. 3.15. Awers szalki z eksplantatami liściowymi etiolowanymi



Rys. 3.16. Rewers szalki z eksplantatami liściowymi etiolowanymi

W kilku szalkach umieszczono również eksplantaty pochodzące z wierzchołka liścia –

Rys. 3.17 – eksplantat o indeksie '1'.

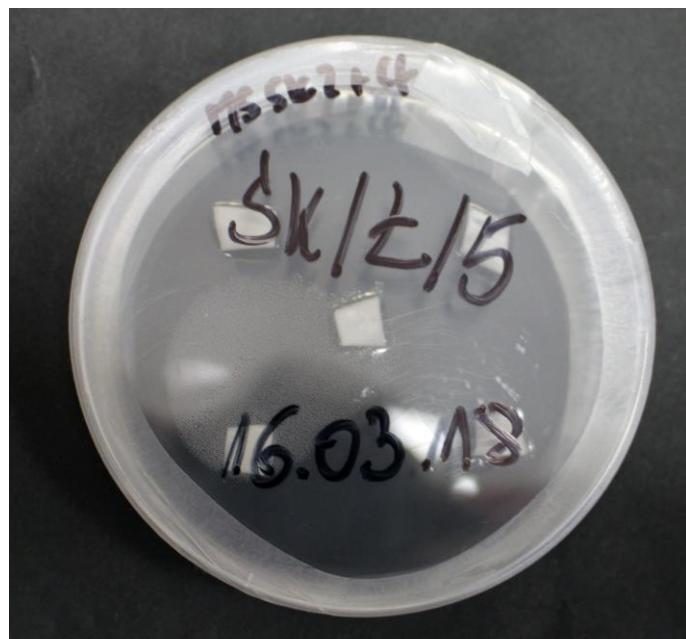


Rys. 3.17. Awers szalki z eksplantatem liściowym pochodzący z wierzchołka liścia.

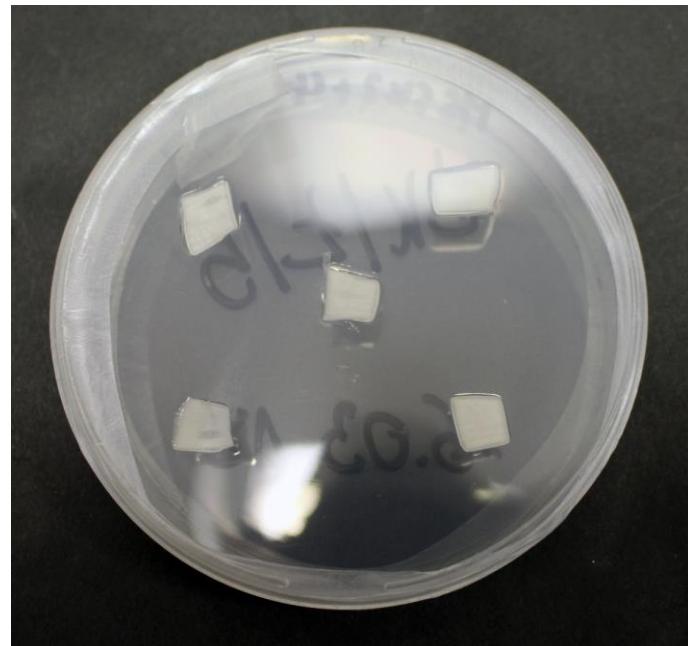
Eksplantaty łuskowe były tworzone z wewnętrznych mięsistych łusek cebulowych. Eksplantaty tworzone z pojedynczych łusek, ciętych na fragmenty 0,5-1,0 [cm]. Wewnętrznych błon nie usuwano. Łuski najbardziej zewnętrzne, które miały kontakt z czynnikami odkażającymi odrzucono. Wszystkie łuski układano horyzontalnie na powierzchni pożywki. Awers oraz rewers szalki przedstawiono na

Rys. 3.18 oraz

Rys. 3.19. Dodatkowo w kilu kulturach założonych 06 kwietnia ŠK/L/2-5 umieszczono po jednym eksplantacie który był pączkiem. Eksplantat zawsze umieszczano w pozycji '5'.



Rys. 3.18. Awers szalki z eksplantatem łuskowym.



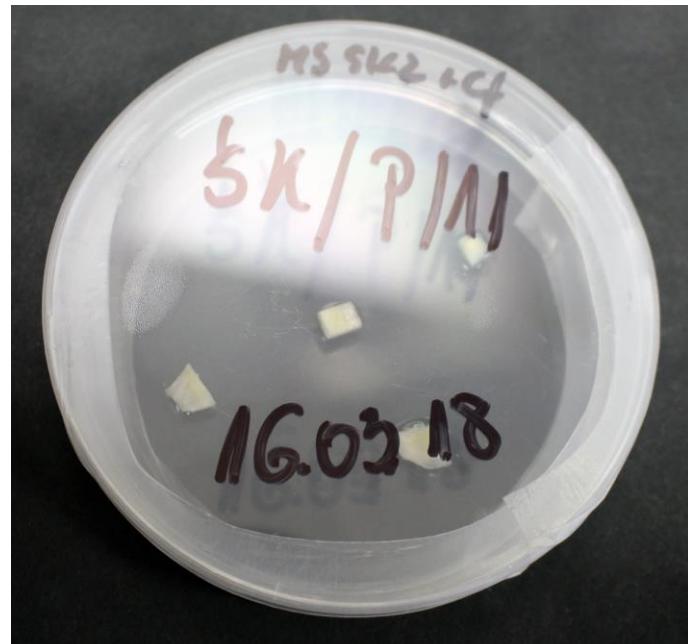
Rys. 3.19. Rewers szalki z eksplantatem łuskowym.

Eksplantaty pochodzące z piętki zakładano z wewnętrznej jej części. Zewnętrzną części odkrawano ze względu na uszkodzenia które powstały przy kontakcie z substancją odkażającą – zewnętrzna część miała ciemniejszy kolor, co można zaobserwować na

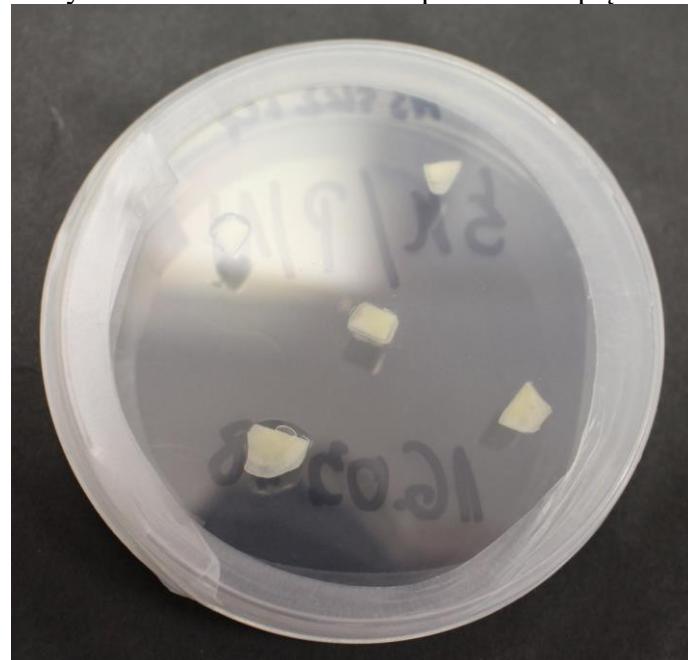
Rys. 3.8. Fragmenty piętki, które stanowiły eksplantat były mniejsze niż w przypadku liści oraz łusek. Ich wielkość była zależna od wielkości cebuli oraz wielkości uszkodzeń spowodowanych działaniem substancji odkażającej. Awers oraz rewers szlaki z eksplantatem pochodzący z piętki przedstawiono na

Rys. 3.20 oraz

Rys. 3.21.



Rys. 3.20. Awers szalki z eksplantatem z piętki.



Rys. 3.21. Rewers szalki z eksplantatem z piętki.

3.1.2.4. Ilość założonych kultur

Jak już wspomniano kultury zakładano w IV turach. Podczas każdej tury zakładano po 6 kultur dla każdego rodzaju eksplantatu co daje 18 kultur na turę. Wyjątkiem była II tura 16.03.2018, kiedy to założono podwójną ilość kultur każdego typu. Łącznie założono 90 kultur, po 30 dla każdego rodzaju eksplantatu. Sumarycznie dało to 450 eksplantatów, 150 sztuk dla każdego rodzaju eksplantatu. Zbiorcze wyniki zostały przedstawione w Tab. 3.2, natomiast szczegółowa rozpiska została dołączona jako Załącznik 3 do niniejszej pracy.

Tab. 3.2. Wykaz kultur założonych dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

Źródło eksplantatu	Data założenia kultury	Pożywka	Ilość szalek	Ilość eksplantatów
Liść	09.03.2018	MS SK2	6	30
		MS SK2+CF	0	0
	16.03.2018	MS SK2	8	40
		MS SK2+CF	4	20
	23.03.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	06.04.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	Suma	MS SK2	14	70
		MS SK2+CF	16	80
		Suma obu poż.	30	150
Łuska	09.03.2018	MS SK2	6	30
		MS SK2+CF	0	0
	16.03.2018	MS SK2	6	30
		MS SK2+CF	6	30
	23.03.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	06.04.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	Suma	MS SK2	12	60
		MS SK2+CF	18	90
		Suma obu poż.	30	150
Piętka	09.03.2018	MS SK2	6	30
		MS SK2+CF	0	0
	16.03.2018	MS SK2	5	25
		MS SK2+CF	7	35
	23.03.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	06.04.2018	MS SK2	0	0
		MS SK2+CF	6	30
	Suma	MS SK2	11	55
		MS SK2+CF	19	95

		Suma obu poż.	30	150
Suma	MS SK2	37	185	
	MS SK2+CF	53	265	
	Suma obu poż.	90	450	

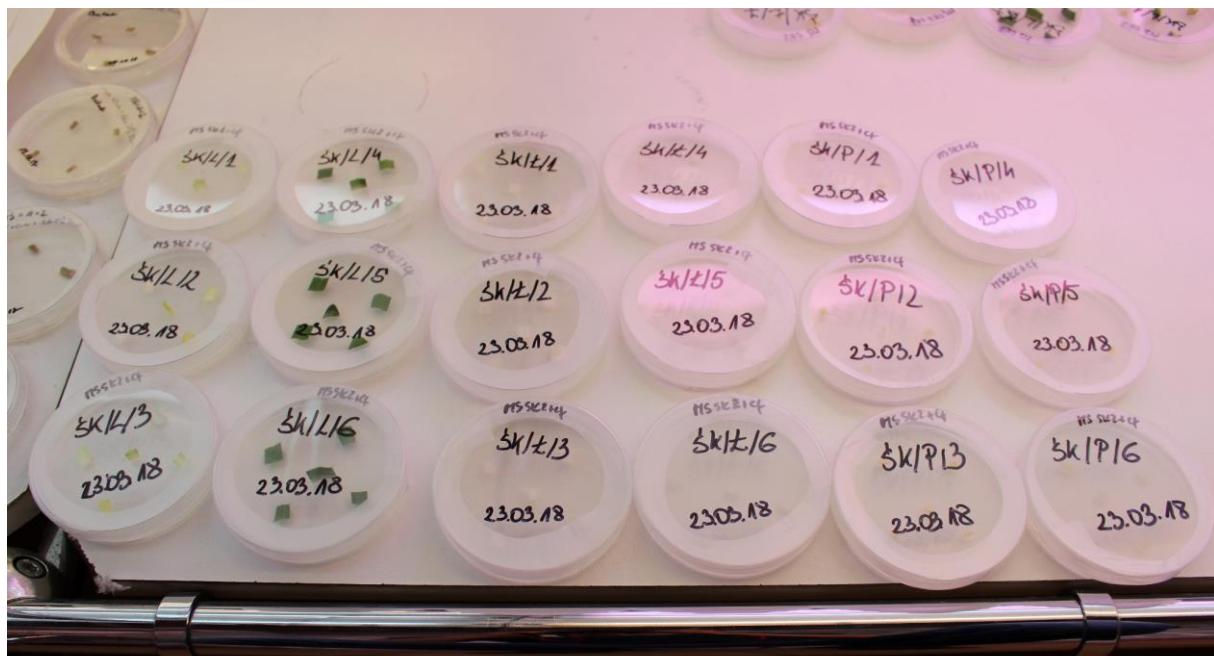
Dodatkowo ze względu na różne rodzaje eksplantatów liściowych przygotowano w Tab. 3.3. zestawienie ilości założonych kultur i eksplantatów z uwzględnieniem różnych ich rodzajów. Łącznie przygotowano 60 eksplantatów z liści etiolowanych, 85 eksplantatów z liści nieetiolowanych oraz 5 z wierzchołków liści nieetiolowanych.

Tab. 3.3. Wykaz kultur założonych dla różnego rodzaju eksplantatu liściowego.

Źródło eksplantatu liściowego	Pożywka	Ilość kultur	Ilość eksplantatów
Liść etiolowany	MSSK2	8	40
	MSSK2+CF	4	20
	Suma obu poż.	12	60
Liść nieetiolowany	MSSK2	6	27
	MSSK2+CF	12	58
	Suma obu poż.	18	85
Wierzchołek liścia	MSSK2	3	3
	MSSK2+CF	2	2
	Suma obu poż.	5	5

3.1.2.5. Warunki prowadzenia kultury

W pierwszym etapie kultury były przechowywane w fitotronie, każda na półce bezpośrednio pod lampą – Rys. 3.22.



Rys. 3.22. Kultury *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w fitotronie.

W fitotronie panowała stała temperatura 21-22 stopnie Celsjusza, przy 16 godzinnej długości dnia oraz 8 godzinnej długości nocy. Czas prowadzenia kultur dla pierwszego etapu wyniósł od 7 do 11 tygodni. Szczegółowe informacje na temat czasu prowadzenia pierwszego etapu zebrano w Tab. 3.4.

Tab. 3.4. Czas prowadzenia pierwszego etapu.

Data założenia kultury	Data zakończenia I etapu	Czas prowadzenia kultury	
		dni	tygodnie
09.03.2018	25.05.2018	78	11
16.03.2018		71	10
23.03.2018		65	9
06.04.2018		50	7

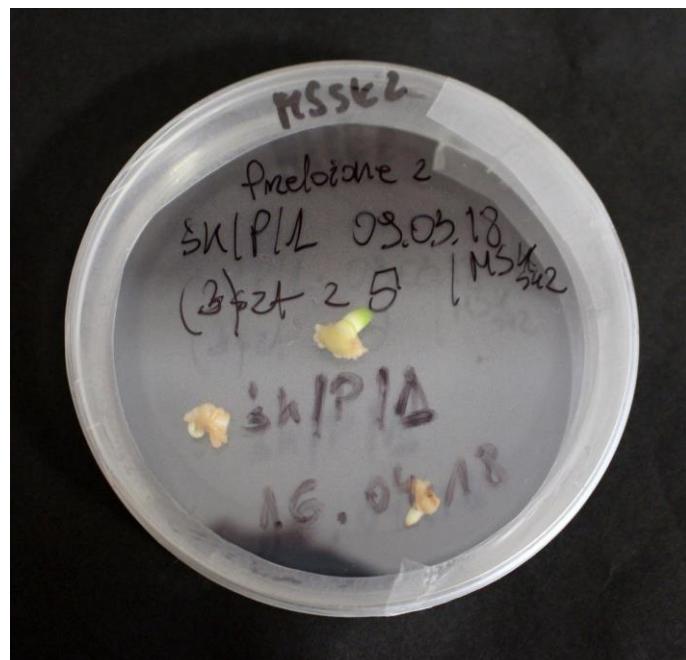
3.1.2.6. Dodatkowe kultury ratunkowe

Ze względu na ilość zakażeń, zdecydowano się na dodatkowy eksperyment. W kulturach gdzie wystąpiło zakażenie, które dotyczało tylko pojedynczego eksplantatu, zdecydowano się przenosić pozostałe nieobjęte zakażeniem eksplantaty do nowej szalki. Przenoszono tylko eksplantaty na których był widoczny rozwój. Na każdej szalce oprócz standardowych oznaczeń umieszczano również oznaczenie kultury źródłowej. Przykład takiej kultury ratunkowej założonej 16 kwietnia przedstawiono na Rys. 3.23 oraz

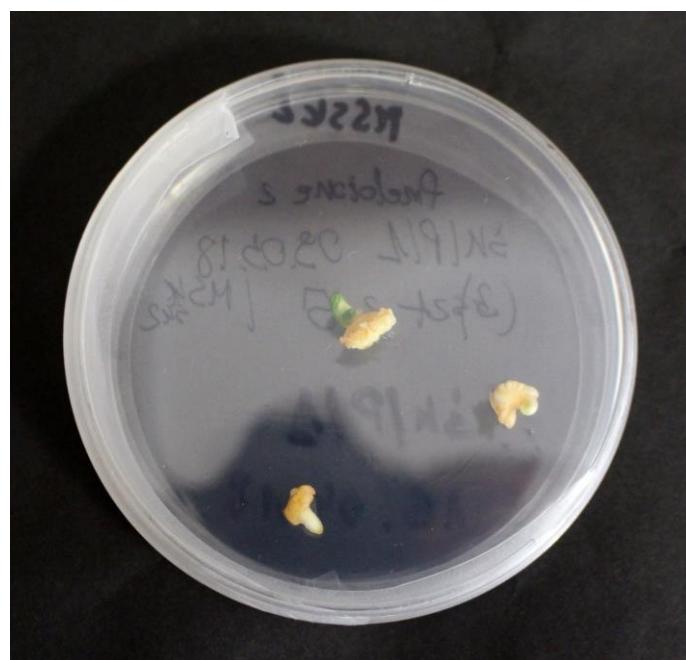
Rys. 3.24. Sumarycznie założono 8 kultur ratunkowych dla 23 eksplantatów, które podjęły wzrost. Szczegółowe dane zebrano w Tab. 3.5. Wynik eksperymentu zostanie przedstawiony w rozdziale czwartym.

Tab. 3.5. Wykaz kultur ratunkowych dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Data założenia	Pożywka	Oznaczenie	Ilość eksplantatów	Kultura/kultury źródłowe
06.04.2018	MSSK2+CF	ŚK/P/7	1	R. 1 szt z ŚK/P/9 16.03.18
16.04.2018	MSSK2	ŚK/P/1	3	R. 3 szt z ŚK/P/1 09.03.18
16.04.2018	MSSK2	ŚK/P/2	2	R. 2 szt z ŚK/P/6 16.03.18
16.04.2018	MSSK2+CF	ŚK/P/3	3	R. 2 szt z ŚK/P/3 + 1 szt z ŚK/P/4 23.03.18
16.04.2018	MSSK2+CF	ŚK/P/4	4	R. 2 szt z ŚK/P/3 + 1 szt z ŚK/P/6 + 1 szt z ŚK/P/9 16.03.18
20.04.2018	MSSK2	ŚK/Ł/1	3	R. 2 szt z ŚK/Ł/3 + 1 szt z ŚK/Ł/5 06.04.18
20.04.2018	MSSK2	ŚK/P/1	3	R. 2 szt z ŚK/P/4 + 1 szt z ŚK/P/3 16.04.18
20.04.2018	MSSK2+CF	ŚK/P/2	4	R. 4 szt z ŚK/P/6 06.04.18
Suma kultur rat.			8	
Suma eksplantatów			23	



Rys. 3.23. Awers kultury ratunkowej ŠK/P/1 z 16 kwietnia.



Rys. 3.24. Rewers kultury ratunkowej ŠK/P/1 z 16 kwietnia.

3.1.3. Etap II – namnażanie

Podczas doświadczenia etap namnażania został pominięty. Regeneraty otrzymane podczas etapu I mikrorozmnażania posłużyły jako baza do etapu III.

3.1.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów

Trzeci etap to jest rozwój i ukorzenianie regeneratów rozpoczął się 25.05.2018, wraz z zakończeniem etapu I. Za materiał bazowy dla kultur w tym etapie posłużyły regeneraty otrzymane bezpośrednio po etapie I mikrorozmnażania. Wszystkie kultury założono tego samego dnia w jednej turze. Etap II jak już wspomniano został pominięty.

3.1.4.1. Skład pożywek

Podobnie jak w etapie I użyto pożywki stałej na bazie „Murashige & Skoog Medium Including Vitamins” firmy „Duchefa Biochemie” – Rys. 3.10. Do pożywki dodano 7,0 g agaru oraz 30,0 g sacharozy. W pożywce nie zastosowano regulatorów wzrostu. Dokładny skład pożywki przedstawiono w Tab. 3.6.

Tab. 3.6. Skład pożywki wykorzystanej do trzeciego etapu mikrorozmnażania.

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
CaCl_2	332,020
MgSO_4	180,540
KH_2PO_4	170,000
Mikroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
FeNaEDTA	36,700
KI	0,830
H_3BO_3	6,300
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
Witaminy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
tiamina (witamina B ₁)	0,1
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5

inozytol (witamina B ₈)	100,0
glicyna	2,0
Pozostałe związki	
Nazwa związku	Ilość [g/l]
agar	7,0
sacharoza	30,0
Cechy pożywki	
Cecha	Wartość
rodzaj pożywki	stała
pH	5,8

Pożywkę wymieniano co 6 tygodni. W końcowej fazie III etapu ze względu na słaby wzrost regeneratów i ukorzenienie regeneratów zdecydowano się na dodanie do pożywki regulatorów wzrostu, 1,0 mg NAA z grupy auksyn oraz 2,0 mg BAP z grupy cytokinin. Skład pożywki zastosowanej w końcowej fazie III etapu zestawiono w Tab. 3.7.

Tab. 3.7. Skład pożywki wykorzystanej do trzeciego etapu mikrorozmnażania w końcowej fazie.

Makroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
NH ₄ NO ₃	1650,000
KNO ₃	1900,000
CaCl ₂	332,020
MgSO ₄	180,540
KH ₂ PO ₄	170,000
Mikroelementy	
Nazwa związku	Ilość [mg/l]
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,700
KI	0,830
H ₃ BO ₃	6,300
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,900
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
Witaminy	

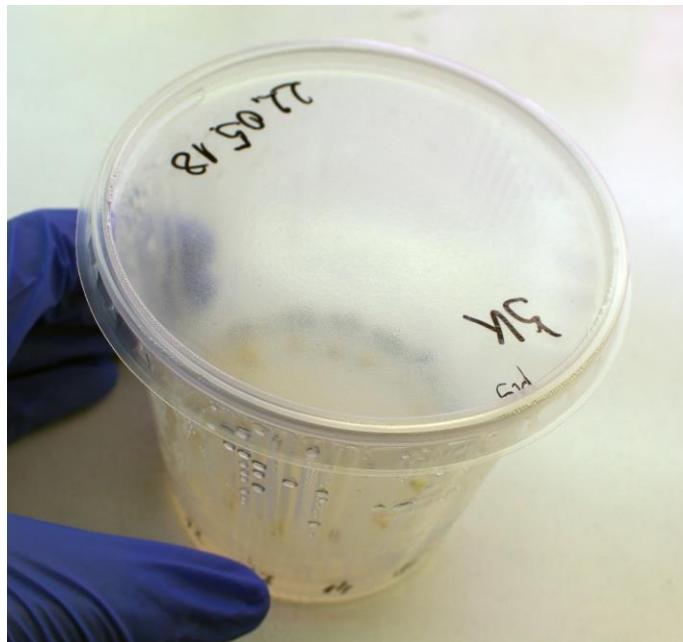
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
tiamina (witamina B ₁)	0,1	
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5	
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5	
inozytol (witamina B ₈)	100,0	
glicyna	2,0	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
NAA	1,0	auksyny
BAP	2,0	cytokininy
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [g/l]	
agar	7,0	
sacharoza	30,0	
Cechy pożywki		
Cecha	Wartość	
rodzaj pożywki	stała	
pH	5,8	

3.1.4.2. Opis kultur oraz numeracja regeneratów

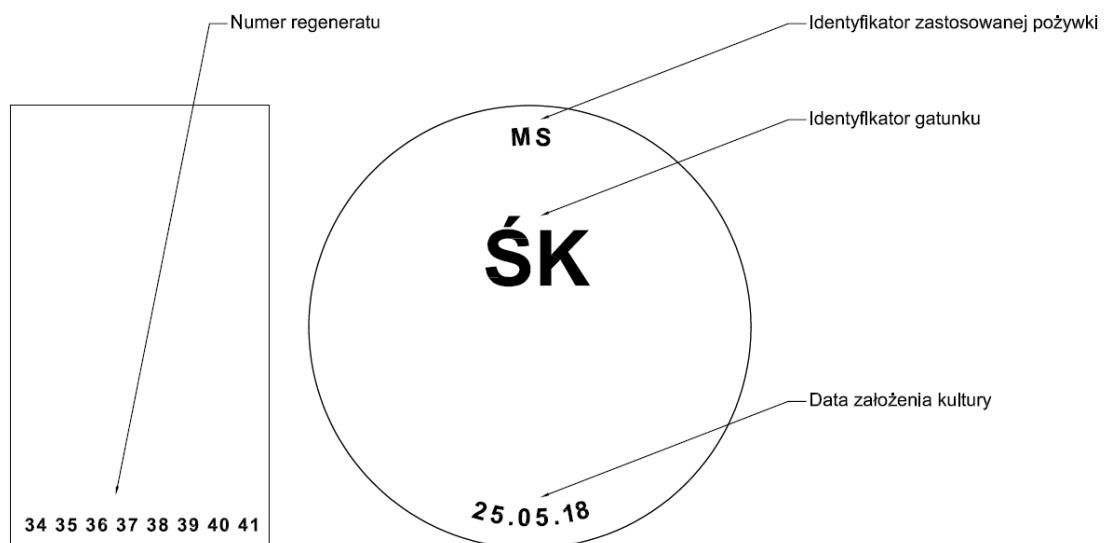
Kultury zakładano w polietylowych pojemnikach w kształcie walca –

Rys. 3.25. Pożywka znajdowała się w dolnej części i stanowiła warstwę o grubości około 2 cm.

Każdy z pojemników był opisany w sposób przedstawiony na Rys. 3.26, opis znajdował się na wieczku oraz w dolnej części pojemnika. Ze względu na numerację regeneratów nie było potrzeby dodatkowego indeksowania pojemników. Na wieczku znajdowały się trzy identyfikatory (prawa strona Rys. 3.26), podobnie jak w przypadku oznaczeń szalek z pierwszego etapu.



Rys. 3.25. Pojemniki wykorzystane do prowadzenia kultur w III etapie mikrorozmnażania



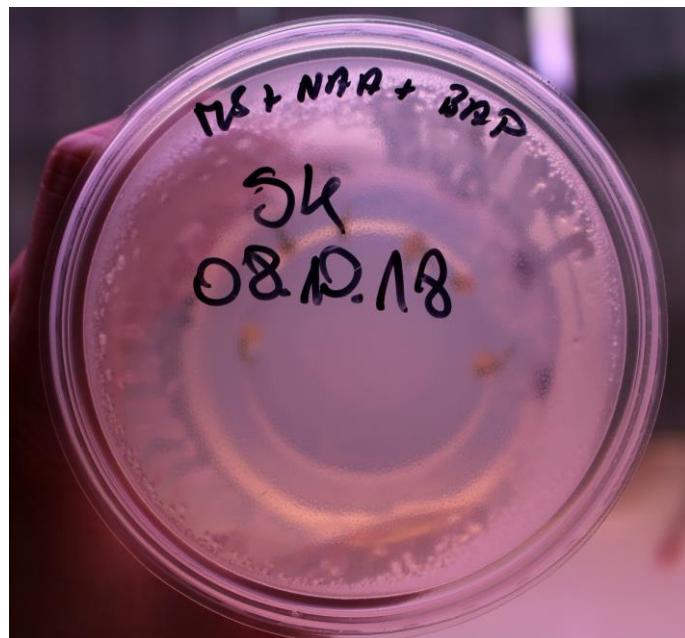
Rys. 3.26. Sposób opisywania pojemników z *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Pierwszym identyfikatorem był identyfikator zastosowanej pożywki umieszczony w górnej części wieczka pojemnika. Dla śnieżycy karpackiej użyto w doświadczeniu dwóch rodzajów pożywek 'MS' –

Rys. 3.25 oraz 'MS + NAA + BAP' –

Rys. 3.27. Poprzez oznaczenie 'MS' należy rozumieć pożywkę bez dodatku regulatorów wzrostu – skład z Tab. 3.6, natomiast poprzez oznaczenie 'MS + NAA + BAP' należy rozumieć pożywkę wzbogaconą o regulatory wzrostu, NAA oraz BAP – skład z Tab. 3.7. Kolejnym

oznaczeniem był identyfikator gatunku. Oznaczenie to znajdowało się w centralnej części wieczka pojemnika. Dla pojemników zawierających regeneraty *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet jego wartość to 'ŚK'. Ostatnim oznaczeniem na pojemniku była data założenia kultury. Informacja ta, znajdowała się w dolnej części wieczka.



Rys. 3.27. Wieczko pojemnika z pożywką 'MS + NAA + BAP'

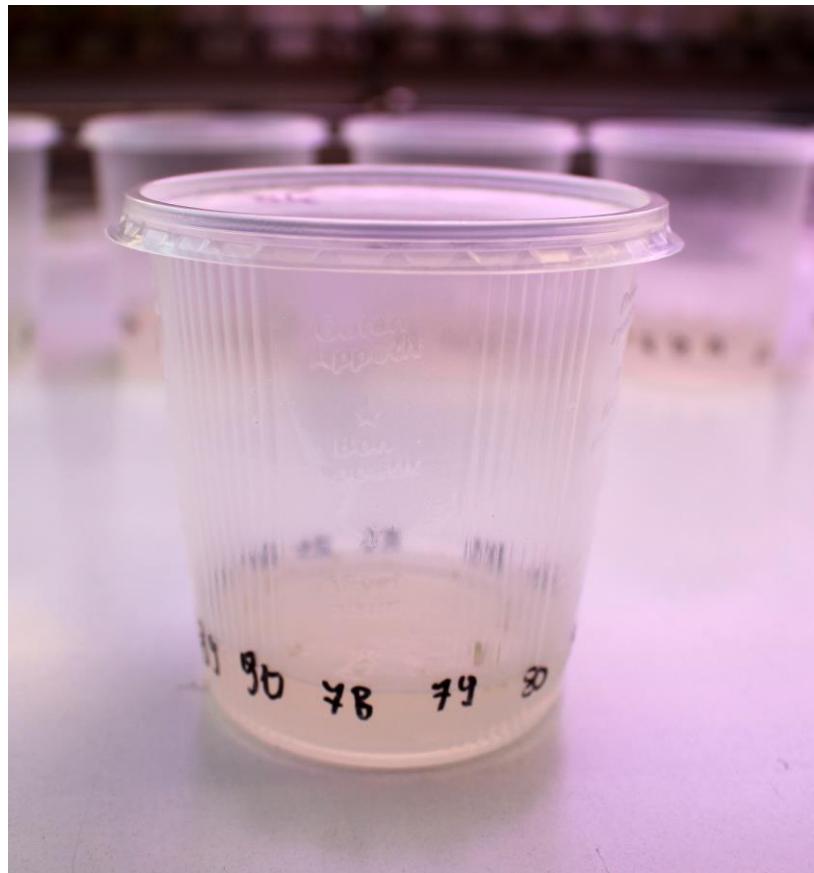
W dolnej części każdego pojemnika znajdował się numer regeneratu –

Rys. 3.28, lewa strona Rys. 3.26. Numeracja regeneratów nie była specyficzna dla danego pojemnika.

3.1.4.3. Sposób zakładania kultur i ich ilość

Do zakładania kultur użyto jedynie regeneratów, które nie nosiły śladów zakażeń czy zamierania. Wszystkie czynności związane z założeniem kultury wykonywano pod komorą laminarną. Każdy z regeneratów oczyszczono z resztek eksplantatu i lekko zagłębiono w pożywce. W przypadku regeneratów, które już posiadały korzenie, starano się zagłębić korzeń w pożywce.

W jednym pojemniku mogły znajdować się regeneraty pochodzące z różnych szalek. Każdy z regeneratów otrzymywał swój indeks pod którym umieszczano w notatkach informację na temat szalki (I etap) z której ów regenerat pochodził – notowano identyfikator szalki oraz datą założenia kultury w I etapie, co wystarczało do jednoznacznej identyfikacji. W jednym pojemniku umieszczono od 10 do 15 regeneratów. Łącznie założono 10 kultur do których założenia wykorzystano 114 regeneratów *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet pochodzących z pierwszego etapu.



Rys. 3.28. Numeracja regeneratów na pojemniku

Zbiorczy wykaz regeneratów wykorzystanych do założenia III etapu zestawiono w Tab. 3.8. Szczegółowy wykaz regeneratów znajduje się w Załącznik 4.

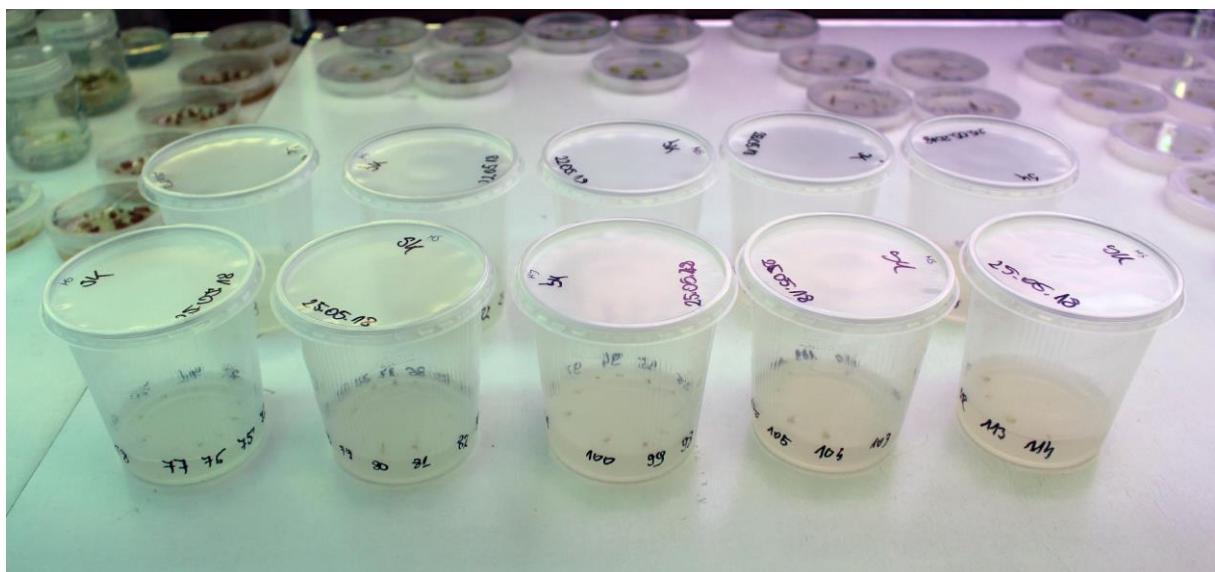
Tab. 3.8. Zbiorczy wykaz regeneratów wykorzystanych do założenia III etapu.

Data założenia szalki źródłowej	Oznaczenie szalki źródłowej	Numery regeneratów	Ilość regeneratów
09.03.2018	ŚK/P/2	32-35	4
16.03.2018	ŚK/Ł/10	36-38	3
	ŚK/P/3	68-71	4
	ŚK/P/5	95-99	5
	ŚK/P/6	72-78	7
	ŚK/P/3	101-103	3
23.03.2018	ŚK/P/4	54-63	10
	ŚK/P/5	79	1
	ŚK/P/6	64-67	4
	ŚK/P/1	80-94	15
06.04.2018	ŚK/P/2	104-110	7
	ŚK/P/3	100	1

	ŚK/P/5	12-22	11
	ŚK/P/7	1-11	11
16.04.2018	ŚK/P/1	39-53	15
	ŚK/P/3	111-114	4
20.04.2018	ŚK/P/1	23-31	9
Suma		114	

3.1.4.4. Warunki prowadzenia kultury

W trzecim etapie mikrorozmnażania podobnie jak w pierwszym kultury były przechowywane w fitotronie, każda na półce bezpośrednio pod lampą – Rys. 3.29.



Rys. 3.29. Kultury *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w fitotronie

W fitotronie panowała stała temperatura 21-22 stopnie Celsjusza, przy 16 godzinnej długości dnia oraz 8 godzinnej długości nocy. Pożywkę zmieniano na świeżą co około 6 tygodni. Etap zakończono dnia 14 grudnia 2018 roku. Czas prowadzenia kultur dla trzeciego etapu wyniósł około 29 tygodni, z czego około 20 tygodni na pożywce bez regulatorów wzrostu oraz około 10 tygodni na pożywce zawierającej dodatek NAA oraz BAP. Szczegółowe informacje na temat czasu prowadzenia trzeciego etapu zebrano w Tab. 3.9.

Tab. 3.9. Czas prowadzenia trzeciego etapu.

Data założenia kultury	Data przejścia na 'MS + NAA + BAP'	Data zakończenia III etapu	Czas prowadzenia kultury					
			Pożywka 'MS'		Pożywka 'MS + NAA + BAP'		Sumarycznie	
			dni	tyg	dni	tyg	dni	tyg
25.05.2018	08.10.2018	14.12.2018	137	20	68	10	205	29

3.1.5. Etap IV – aklimatyzacja

Ze względu na słaby rozwój regeneratów w etapie III i ich niedostateczną wielkość do etapu IV, doświadczenie zostało zakończone na etapie III.

3.1.6. Badanie żywotności pyłku

Jak wspomniano w rozdziale 2.1.5 główną przyczyną tego iż *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet jest rośliną rzadką jest fakt jej związania z specyficznym rodzajem siedlisk, to jest podmokłych łąk, które często są obecnie osuszane. Zdecydowano się jednak wykonać dodatkowe mikrodoświadczenie, które pozwoliłyby sprawdzić czy inne czynniki takie jak np. żywotność pyłku, nie mają również negatywnego wpływu naczęstość występowania tego gatunku.

Badanie żywotności pyłku wykonano dwoma metodami, z wykorzystaniem barwnika Aleksandra oraz z wykorzystaniem acetokarminu –

Rys. 3.30. W przypadku barwnika Aleksandra barwione są zarówno komórki żywe jak i martwe. Żywe komórki barwione są na kolor różowo-fioletowy, natomiast martwe na zielono. W przypadku acetokarminu żywe komórki barwione są na kolor czerwono-pomarańczowy, natomiast martwe nie są barwione.



Rys. 3.30. Barwnik Aleksandra oraz acetokarmín wykorzystane w doświadczeniu

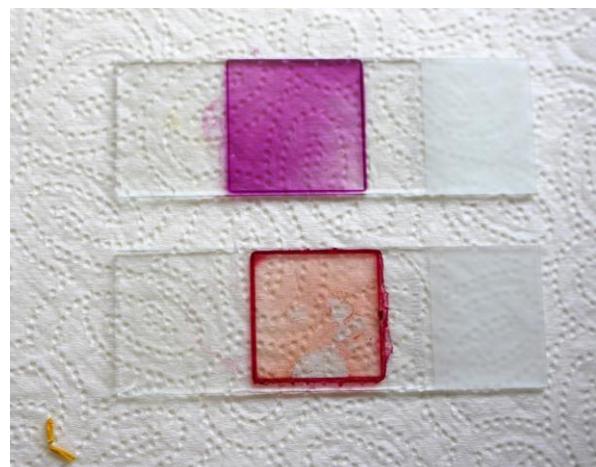
Doświadczenie odbyło się według następującej procedury:

1. Pobranie pylników z roślin za pomocą pęsety. Pobrane pylniki umieszczone na fragmencie papieru – Rys. 3.31.
2. Za pomocą pęsety wysypano pyłek na szkiełko podstawowe i zalano pyłek dwoma kroplami barwnika.



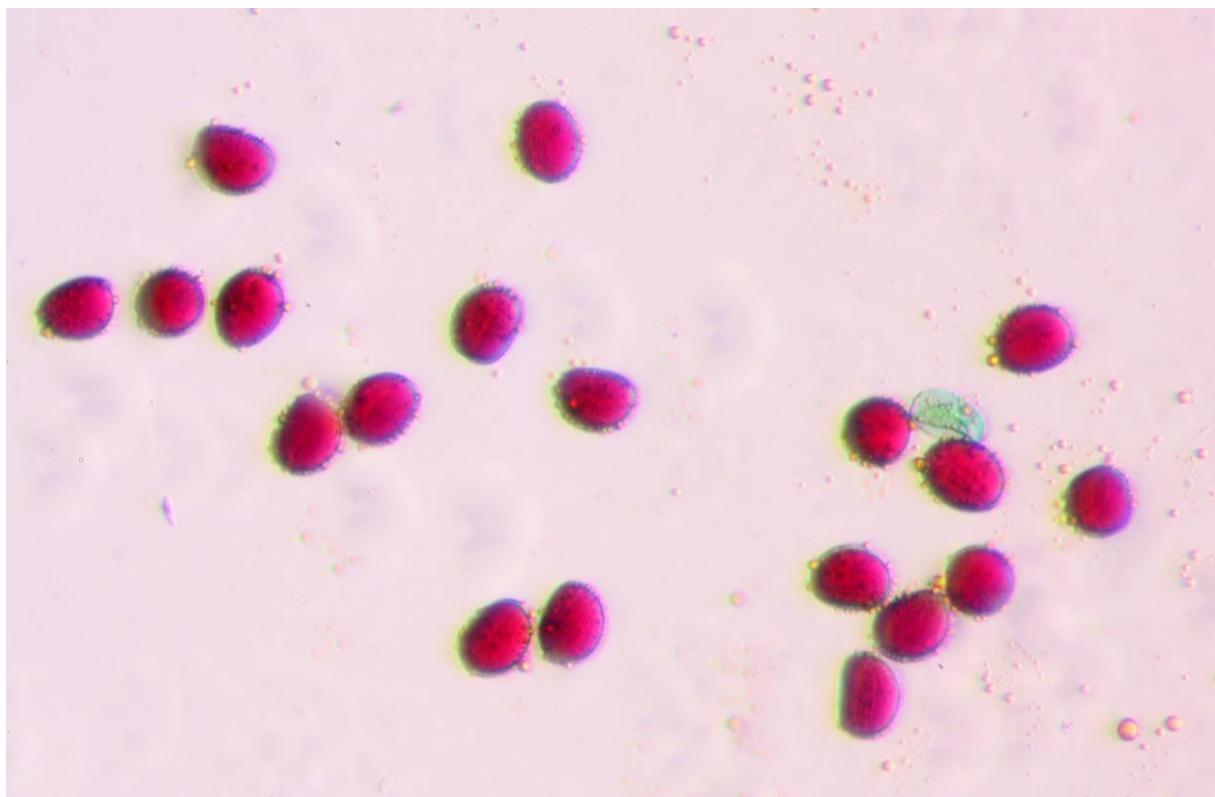
Rys. 3.31. Wyizolowane pylniki *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

3. Następnie nałożono szkiełko nakrywkowe. Przygotowano po dwa preparaty dla każdego rodzaju barwnika co dało łącznie cztery preparaty – Rys. 3.32.



Rys. 3.32. Przygotowane preparaty z barwnikiem Aleksandra (o góry) oraz acetokarminem (u dołu)

4. Odczekano 15 minut.
5. Dla każdego z preparatów sprawdzono pod mikroskopem stan żywotności co najmniej 300 ziaren pyłku. Obserwację pod mikroskopem prowadzono z wykorzystaniem obiektywu 40x oraz okularów o powiększeniu 10x. Dla każdego pola widzenia zanotowano ilość żywych i martwych ziaren pyłku. Przykładowe pole widzenia dla badanego pyłku z barwnikiem Aleksandra przedstawiono na Rys. 3.33. Znajduje się tutaj 18 żywych ziaren pyłku (kolor różowo-fioletowy) oraz 1 martwe ziarno pyłku (kolor zielony). Przykładowe pole widzenia dla badanego pyłku z użyciem acetokarmelu przedstawiono na Rys. 3.34. Znajduje się tutaj 21 żywych ziaren pyłku (kolor czerwono-pomarańczowy) oraz 1 martwe ziarno pyłku (brak zabarwienia). Wyniki doświadczenia przedstawiono i omówiono w rozdziale 4.5.



Rys. 3.33. Przykładowe pole widzenia z ziarnami pyłku zbarwionymi barwnikiem Aleksandra



Rys. 3.34. Przykładowe pole widzenia z ziarnami pyłku zbarwionymi acetokarminem

3.2. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris* L.

W przypadku szachownicy kostkowej *Fritillaria meleagris* L. wykonano badanie protokołu mikrorozmnażania metodą organogenezy bezpośredniej dla roślin pobranych z środowiska naturalnego oraz zbadano żywotność pyłku pochodzącego od zebranych roślin. Rośliny mateczne pobrano jednokrotnie 31 marca 2018 roku, natomiast kultury zakładano w III turach, 16 kwietnia, 27 kwietnia oraz 11 maja 2018 roku. Planowano również użyć fragmentów roślin otrzymanych z siewu w warunkach *in-vitro* (nasiona pochodziły z handlu), jednakże nasiona nie skiełkowały. Wysiew przeprowadzono jednokrotnie 02 marca 2018 roku.

3.2.1. Etap 0 – selekcja oraz przygotowanie rośliny matecznej

3.2.1.1. Pobranie roślin matecznych z środowiska naturalnego

Szachownicę kostkową *Fritillaria meleagris* L. pobrano dnia 31 marca 2018 roku z rezerwatu florystycznego „Szachownica w Krównikach” –

Rys. 2.21,

Rys. 3.35.



Rys. 3.35. Rezerwat „Szachownica w Krównikach” [24]

Rośliny znajdowały się na podmokłej żyznej łące. Cebule unosiły się na powierzchni wody lub znajdowały się płytka w glebie. Wydobyto 20 całych roślin za pomocą ręcznej łypatki lub

zbierając unoszące się w wodzie cebulki. Rośliny pobrano z różnych miejsc na stanowisku, tak aby nie przetrzebić jednego miejsca. Rośliny przetransportowano do Przemyśla – miejsca zamieszkania autora pracy, gdzie przesadzono je do doniczek z ziemią uniwersalną. Rośliny były przechowywane na klatce schodowej gdzie panowała temperatura ponad 10 °C, w tym jedną noc w temperaturze ponad 20 °C. Ze względu na zbyt wysoką temperaturę rośliny podjęły wzrost.

Dnia 06 kwietnia 2018 roku pobrane rośliny przetransportowano do wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Były one tam przechowywane w warunkach 17 °C. Dnia 06 kwietnia 2018, a wiec w momencie dostarczenia roślin do wydziału rośliny miały już rozwinięte lisice oraz nabrzmiały pąki kwiatowe –

Rys. 3.36, Rys. 3.37.



Rys. 3.36. Pobrane osobniki *Fritillaria meleagris* L. dnia 06.04.2018



Rys. 3.37. Pobrane osobniki *Fritillaria meleagris* L. dnia 06.04.2018.

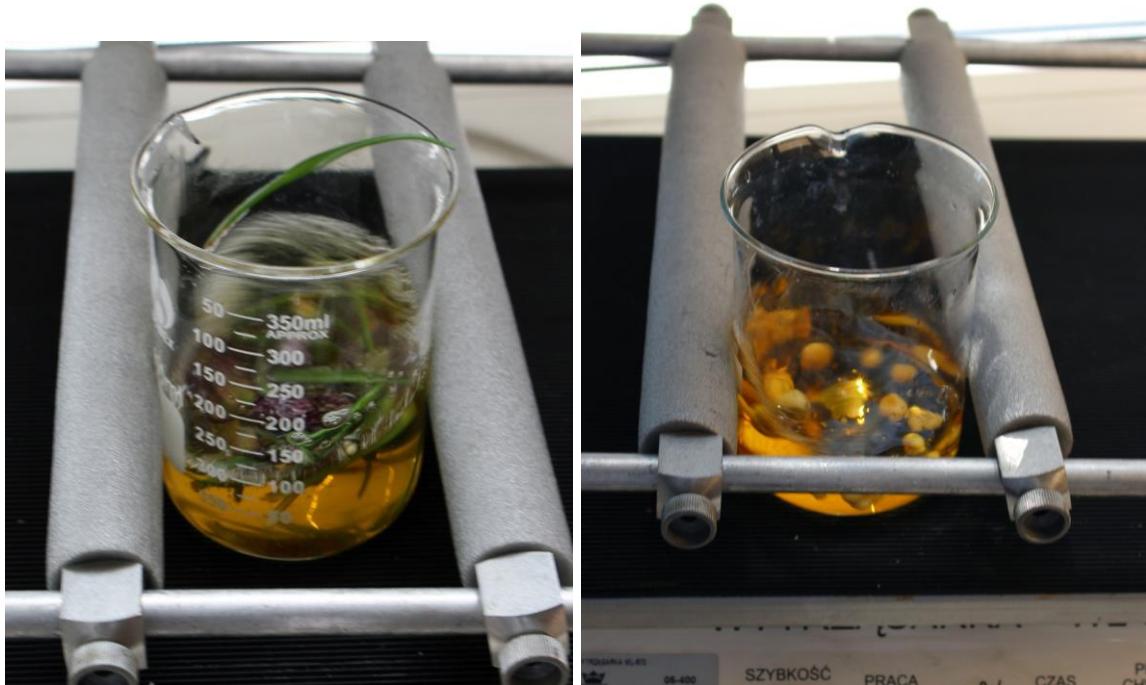
3.2.1.2. Izolacja materiału roślinnego z rośliny matecznej

Rośliny wyjęto z doniczki oczyszczono z podłoża pod bieżącą wodą. Oddzielono część nadziemną od cebuli. W przypadku części nadziemnej jedynie liście, łodygi oraz kwiaty o najlepszym turgorze zostały wybrane jako baza do założenia kultury. Liście oddzielono od łodygi i przemyto osobno pod bieżącą wodą. Łodygę pocięto na mniejsze fragmenty, z kwiatów wyizolowano działa okwiatu, resztę odrzucono. Z części podziemnej rośliny usunięto korzenie za pomocą noża, uważając aby nie zniszczyć piętki. Cebule przemyto pod bieżącą wodą następnie umieszczone w zlewce z wodą. Część nadziemna jak i podziemna przygotowano do odkażania w osobnych zlewach.

3.2.1.3. Odkażanie

Odkażanie materiału roślinnego *Fritillaria meleagris* L. przeprowadzono według procedury takiej samej jak dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet po modyfikacji to jest:

- usunięto wodę ze zlewek a w jej miejsce wlano 70% roztwór wodny etanolu (C_2H_5OH),
- rozpoczęto ręczne mieszanie przez czas 1 minuty,
- usunięto roztwór etanolu a w jego miejsce dodano 20 % roztwór wodny chloraminy (NH_2Cl). Wieczko zlewek okryto folią aluminiową,
- rozpoczęto mieszanie na wytrząsarce WL-972 przez czas 25 minut –
- Rys. 3.38,
- po tym czasie przeniesiono zleweki pod działającą komorę laminarną,
- roztwór chloraminy usunięto do zbiorczej zleweki i rozpoczęto proces płukania w wodzie destylowanej. Do zlewek z materiałem roślinnym oddano wody destylowanej na czas 5 minut,
- następnie wodę destylowaną z zlewek z materiałem roślinnym zlano do zleweki zbiorczej i zastąpiono ją świeżą wodą destylowaną na czas 5 minut
- czynność z powyższego punktu powtórzono,
- następnie wodę destylowaną z zlewek z materiałem roślinnym zlano do zleweki zbiorczej i zastąpiono ją świeżą wodą destylowaną w której cały materiał roślinny pozostał już do czasu wyłożenia na pożywkę



Rys. 3.38. Wytrząsanie materiału roślinnego z roztworem chloraminy na wytrząsarce WL-972.

W przypadku nasion były one dodatkowo zabezpieczone sitkiem w czasie odkażania, dodatkowo zmodyfikowano punkt czwarty powyższej procedury w ten sposób, że zrezygnowano z wytrząsania w wytrząsarce oraz czas ekspozycji na chloraminę wyniósł 20 minut zamiast 25 minut. Odkażone i wypłukane nasiona przygotowane do wyłożenia przedstawiono na

Rys. 3.39.



Rys. 3.39. Odkażony i wypłukany materiał roślinny po etapie 0 – nasiona.

3.2.2. Etap I – inicjacja kultury

Jak już wspomniano, kultury *Fritillaria meleagris* L. zakładano w trzech turach 16 kwietnia, 27 kwietnia oraz 11 maja 2018 roku.

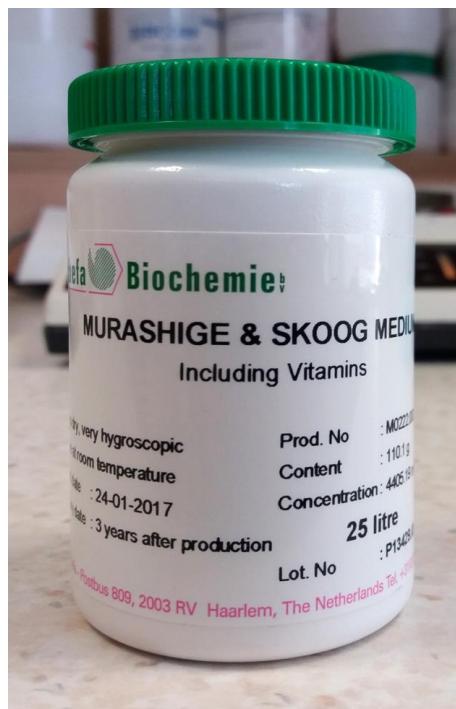
3.2.2.1. Skład pożywek

W doświadczeniu użyto pożywki stałej na bazie tej z publikacji [20], skład z Tab. 2.7. Użyto jednej pożywki do wszystkich rodzajów eksplantatów. Wprowadzono jednak kilka modyfikacji,

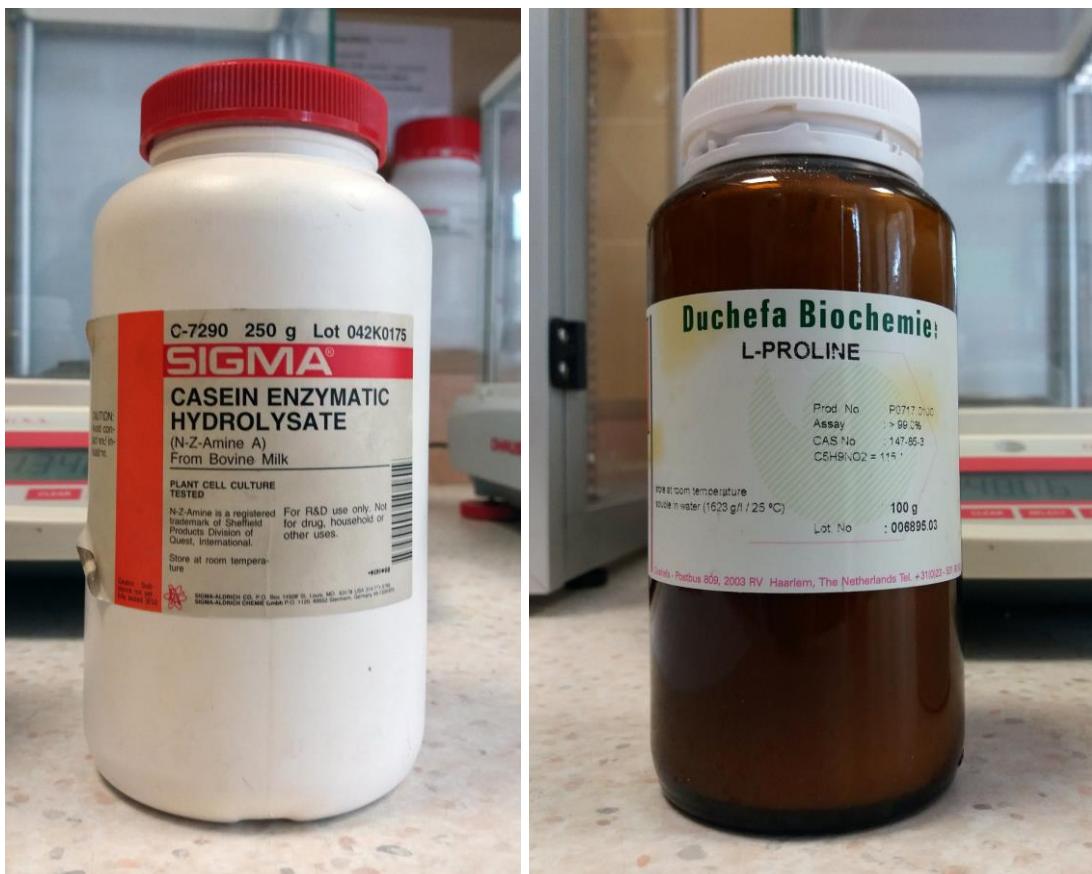
- jako bazy użyto gotowej pożywki MS z witaminami „Murashige & Skoog Medium Including Vitamins” firmy „Duchefa Biochemie” – Rys. 3.40. Jej jest dostępny jako Załącznik 2 do pracy lub na stronie producenta [23].
- ilość agaru zmieniono z 7,0 [g/l] na 6,5 [g/l].

L-proolina oraz hydrolizat kazeiny użyte do sporządzenia pożywki przedstawiono na

Rys. 3.41. Kompletny skład pożywki użytej do I etapu mikrorozmnażania *Fritillaria meleagris* L. zestawiono w Tab. 3.10. W III turze zakładania kultur, ze względu na dużą ilość zakażeń w poprzednich turach, zdecydowano rozszerzyć skład pożywki o antybiotyk – cefotaksym w ilości 25 [ml/l].



Rys. 3.40. Pożywka firmy Duchefa Biochemie wykorzystana jako baza w doświadczeniu



Rys. 3.41. Hydrolizat kazeiny oraz L-Prolina wykorzystane jako składnik pożywki

Tab. 3.10. Skład pożywki wykorzystanej do pierwszego etapu mikrorozmnażania.

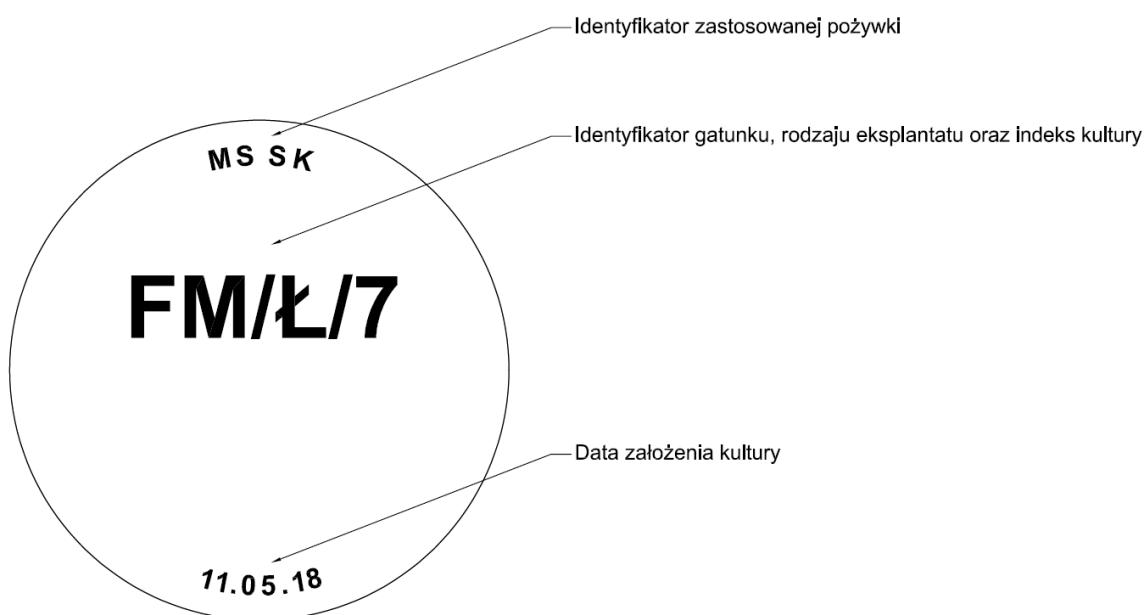
Makroelementy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
NH_4NO_3	1650,000	
KNO_3	1900,000	
CaCl_2	332,020	
MgSO_4	180,540	
KH_2PO_4	170,000	
Mikroelementy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	
FeNaEDTA	36,700	
KI	0,830	
H_3BO_3	6,300	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Witaminy		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
tiamina (witamina B ₁)	0,1	
pirydoksyna (witamina B ₆)	0,5	
kwas nikotynowy (witamina B ₃)	0,5	
inozytol (witamina B ₈)	100,0	
glicyna	2,0	
Białka		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	
L-prolina	250,0	
hydrolizat kazeiny	250,0	
Regulatory wzrostu		
Nazwa związku	Ilość [mg/l]	Grupa
TDZ	1,0	cytokininy
Pozostałe związki		
Nazwa związku	Ilość [g/l]	

agar	6,5
sacharoza	30,0
Cechy pożywki	
Cecha	Wartość
rodzaj pożywki	stała
pH	5,8

W przypadku nasion *Fritillaria meleagris* L. użyto pożywki 'MS' bez dodatku regulatorów wzrostu czy białek. Jej skład jest taki sam jak dla etapu III w przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet i jest dostępny w Tab. 3.6.

3.2.2.2. Opis kultur

Kultury zakładano w szalkach Petriego wykonanych z tworzywa sztucznego. Każda z szalek była opisana za pomocą identyfikatorów przedstawionych na Rys. 3.42. Nie mieszano różnych rodzajów eksplantatów czy też gatunków w pojedynczej szalce.



Rys. 3.42. Sposób opisywania szalek Petriego z *Fritillaria meleagris* L.

Każda kultura posiadała identyfikator zastosowanej pożywki umieszczony w górnej części wieczka szalki. Dla szachownicy kostkowej użyto w doświadczeniu dwóch rodzajów pożywek 'MS SK' oraz 'MS SK+A'. Poprzez oznaczenie 'MS SK' należy rozumieć pożywkę na której skład zestawiono w Tab. 3.10, natomiast poprzez 'MS SK+A' należy rozumieć pożywkę o takim samym składzie jak 'MS SK', ale z dodatkiem antybiotyku cefotaksym w dawce 25 [ml/l]. Samo oznaczenie było nanoszone na szalkę w momencie rozlewania pożywki do szalek

Petriego, jeszcze przed wyłożeniem eksplantatów, pomagało wiec również uniknąć pomyłki z pożywką przeznaczoną dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

Kolejnym oznaczeniem był identyfikator gatunku, rodzaju eksplantatu oraz indeks kultury. Oznaczenie to znajdowało się w centralnej części szalki. Kolejne identyfikatory były oddzielone ukośnikiem. Pierwszy identyfikator to identyfikator gatunku, dla szalek zawierających eksplantaty pochodzące od *Fritillaria meleagris* L jego wartość to 'FM'. Drugi identyfikator to identyfikator rodzaju eksplantatu. Dla szachownicy kostkowej przyjmował on w doświadczeniu następujące wartości:

- 'L' – kiedy eksplantat pochodził z liścia
- 'Ł' – kiedy eksplantat pochodził z łuski wewnętrznej cebuli
- 'ŁD' – kiedy eksplantat pochodził z łodygi nadziemnej
- 'P' – kiedy eksplantat pochodził z piętki (skróconej łodygi podziemnej u cebulowych)
- 'PŁ' – kiedy eksplantat pochodził z fragmentów działań okwiatu

Trzecim identyfikatorem jest indeks kultury, numeracja zaczyna się od 1, jest specyficzna dla danego rodzaju eksplantatu oraz daty założenia kultury.

Ostatnim oznaczeniem na szalce była data założenia kultury. Informacja ta, znajdowała się w dolnej części wieczka.

W przypadku kultur z nasionami, oznaczenia były podobne z tą różnicą, że zamiast identyfikatora gatunku, rodzaju eksplantatu oraz indeksu kultury użyto jedynie identyfikatora gatunku 'FM'. Wygląd nasion oraz mała ilość kultur pozwalały na bezbłędną modyfikację.

3.2.2.3. Sposób przygotowania oraz wykładania eksplantatów

Podobnie jak w przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet wszystkie czynności były wykonywane w działającej komorze laminarnej. W każdej szalce umieszczono pięć eksplantatów. Ułożenie eksplantatów na szlachce wraz z ich numeracją zostało przedstawione na

Rys. 3.12. Po umieszczeniu wszystkich eksplantatów na pożywce, brzegi szalek zostały zabezpieczone za pomocą gumowych pasków.

Eksplantatem liściowym był środkowy, kwadratowy fragment liścia o długości około 0,5-1,0 [cm] –

Rys. 3.43 oraz

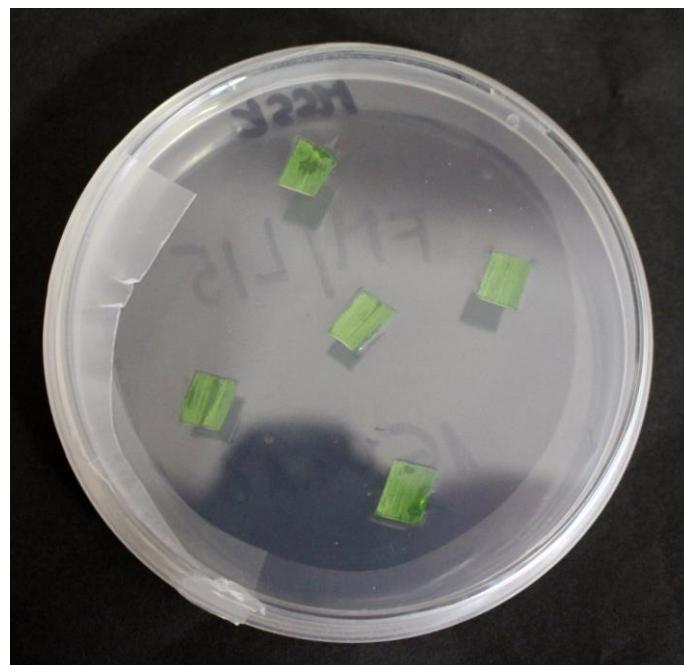
Rys. 3.44 lub prostokątny o wymiarach około 2,0 [cm] x 0,5 [cm] –

Rys. 3.45 i

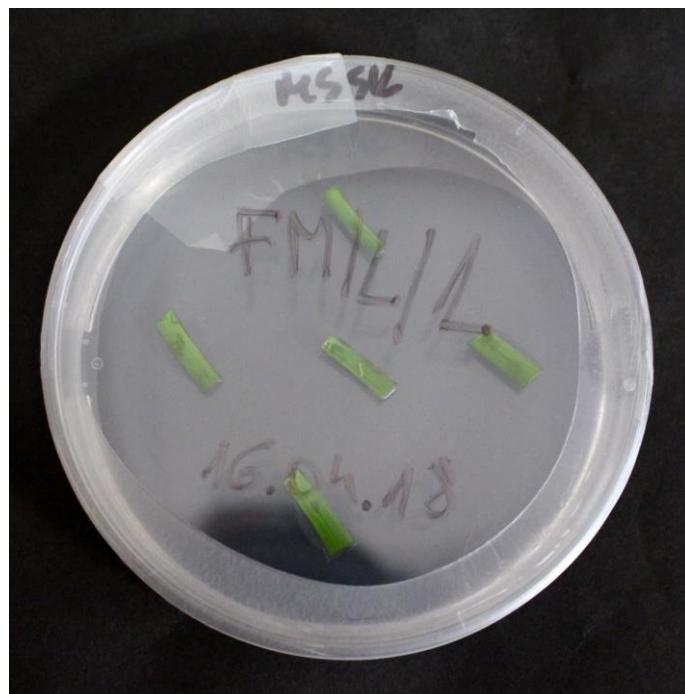
Rys. 3.46. Brzegi liścia zostały odcięte. Eksplantaty w każdej szalce były umieszczone horyzontalnie na powierzchni pożywki.



Rys. 3.43. Awers szalki z eksplantatami liściowymi „kwadratowymi”



Rys. 3.44. Rewers szalki z eksplantatami liściowymi „kwadratowymi”



Rys. 3.45. Awers szalki z eksplantatami liściowymi „prostokątnymi”

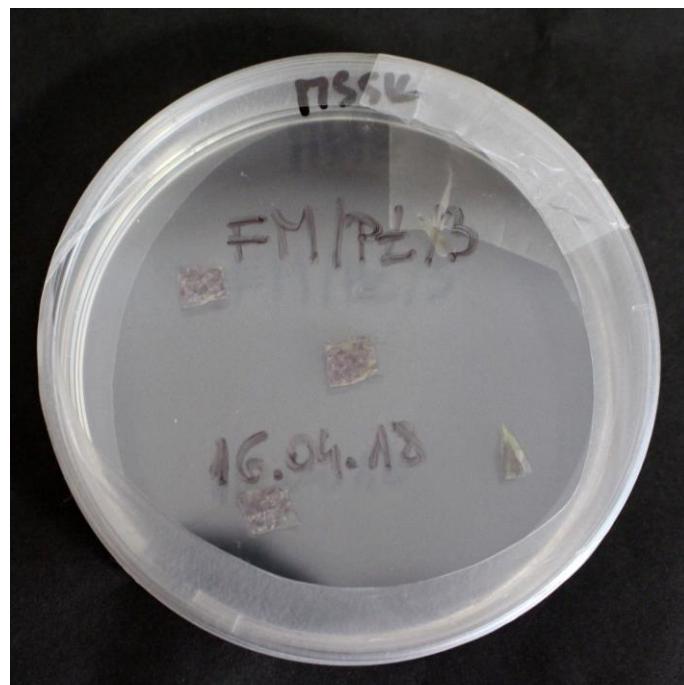


Rys. 3.46. Rewers szalki z eksplantatami liściowymi „prostokątnymi”

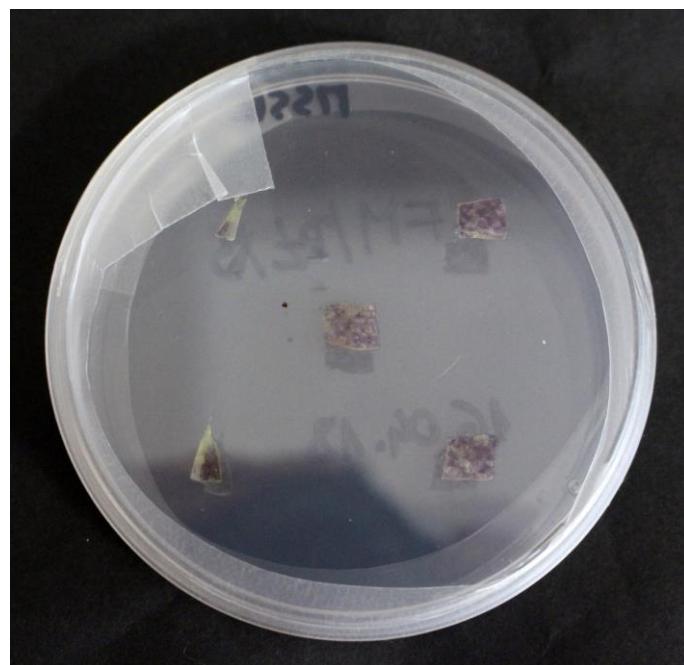
Eksplantaty pochodzące z działek okwiatu były tworzone z jego wewnętrznych części, części skrajne, który miały największy kontakt substancją odkażającą odcięto i odrzucono. Wszystkie fragmenty układano horyzontalnie na powierzchni pożywki. Awers oraz rewers szalki z eksplantatami pochodzącyimi z działek okwiatu przedstawiono na

Rys. 3.47 oraz

Rys. 3.48.



Rys. 3.47. Awers szalki z eksplantatem liściowym pochodzący z wierzchołka liścia



Rys. 3.48. Awers szalki z eksplantatem liściowym pochodzący z wierzchołka liścia

Eksplantaty pochodzące z nadziemnej łodygi były tworzone po usunięcie liści z podłużnych jej fragmentów o długości 2,0-3,0 [cm], przeciętych wzdłużnie na dwie części– Rys. 3.49 oraz

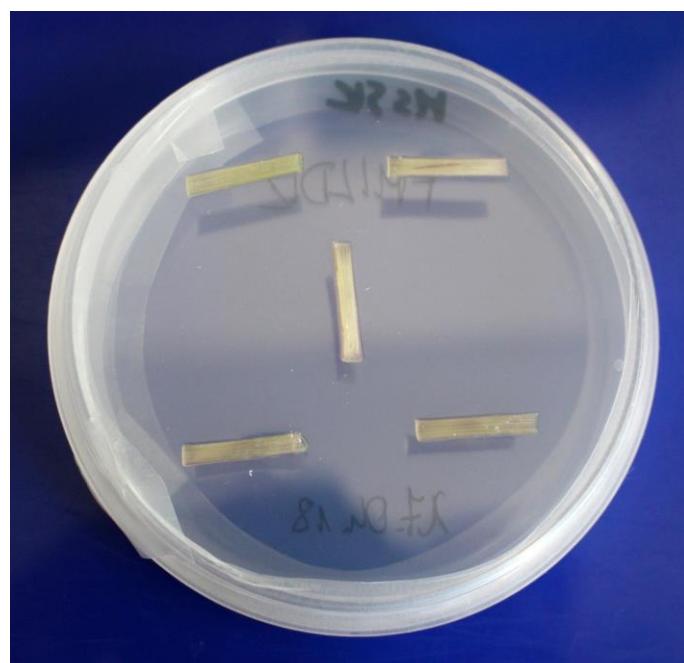
Rys. 3.50 lub z fragmentów przekroju poprzecznego (eksplantaty o indeksie '2', '3' oraz '5')

—
Rys. 3.51 oraz

Rys. 3.52. W przypadku tych pierwszych strona wewnętrzna przekroju podłużnego była skierowana do powierzchni pożywki. Wszystkie eksplantaty układano na powierzani pożywki horyzontalnie.



Rys. 3.49. Awers szalki z eksplantatem łodygowym z fragmentami podłużnymi



Rys. 3.50. Rewers szalki z eksplantatem łodygowym z fragmentami podłużnymi



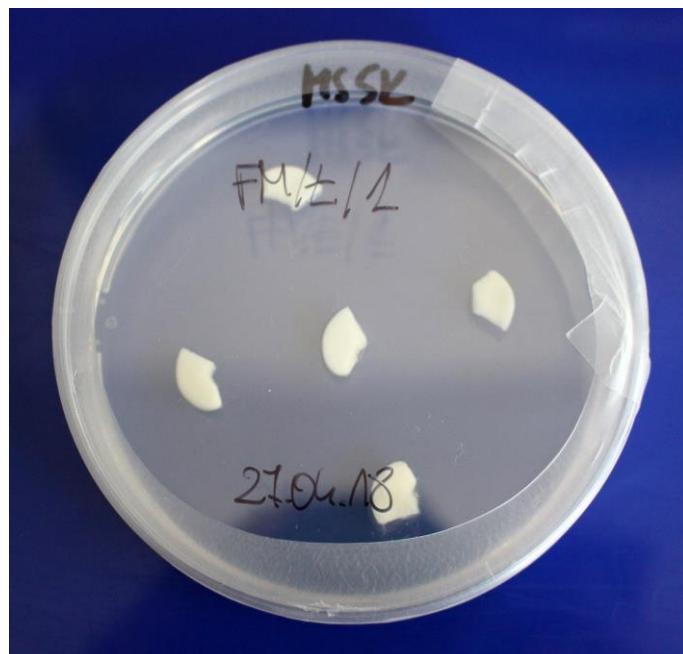
Rys. 3.51. Awers szalki z eksplantatem łodygowym z fragmentami poprzecznymi



Rys. 3.52. Rewers szalki z eksplantatem łodygowym z fragmentami poprzecznymi

W cebulach szachownicy kostkowej trudno było wyróżnić pojedynczą łuskę spichrzową. Całą cebulę przypominała bardziej w budowie łuskobulwę z tkanką z spichrzową. Z tego względu do przygotowania eksplantatów łuskowych posłużyły fragmenty cebul, które zawierały wiele łusek – inaczej niż w przypadku śnieżycy, gdzie jako eksplantat posłużyła pojedyncza łuska lub jej fragment. Cebulę cięto na fragmenty około 1,0-1,5 cm. Wszystkie fragmenty cebuli układano horyzontalnie na powierzchni pożywki. Awers oraz rewers szalki z eksplantatami łuskowymi przedstawiono na Rys. 3.53 oraz

Rys. 3.54.



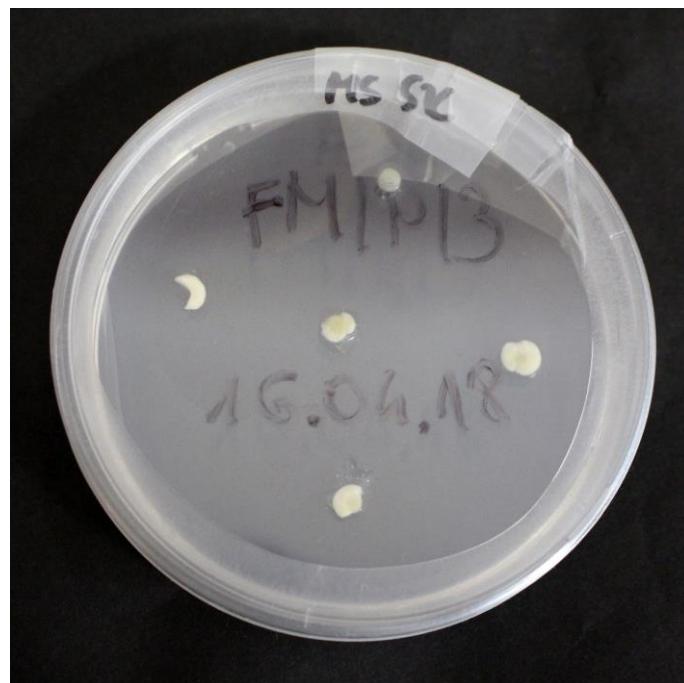
Rys. 3.53. Awers szalki z eksplantatem łuskowym



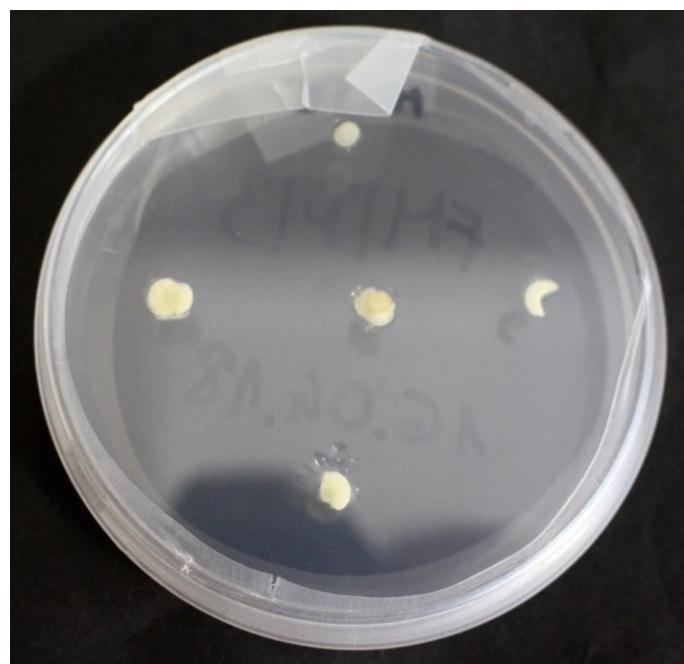
Rys. 3.54. Rewers szalki z eksplantatem łuskowym

Piętka u szachownicy kostkowej ma bardzo mały rozmiar. Jako eksplantat posłużył więc fragment piętki wraz z najbliższymi łuskami. Eksplantaty pochodzące z piętki były mniejsze niż w przypadku liści, działek okwiatu, łodygi nadziemnej oraz łusek. Awers oraz rewers szlaki z eksplantatem pochodzącym z piętki przedstawiono na Rys. 3.55 oraz

Rys. 3.56.



Rys. 3.55. Awers szalki z eksplantatem z piętki



Rys. 3.56. Rewers szalki z eksplantatem z piętki

Kultury z nasionami założono jednokrotnie dnia 02 marca 2018 roku. W jednej kulturze umieszczone horyzontalnie 4 nasiona –

Rys. 3.57.



Rys. 3.57. Rewers szalki z nasionami

3.2.2.4. Ilość założonych kultur

Jak już wspomniano kultury zakładano w III turach oraz dodatkowej turze gdzie przygotowano jedynie kultury z nasionami. Łącznie założono 63 kultury 4 dla nasion i działek okwiatu, 10 dla liści, nadziemnej łodygi i piętki oraz wewnętrznych łusek cebulowych. Sumarycznie dało to 311 eksplantatów. Zbiorcze wyniki zostały przedstawione w Tab. 3.11, natomiast szczegółowa rozpiska została dołączona jako Załącznik 5 do niniejszej pracy.

Tab. 3.11. Wykaz kultur założonych dla *Fritillaria meleagris* L.

Źródło eksplantatu	Data założenia kultury	Pożywka	Ilość szalek	Ilość eksplantatów
Nasiona	02.03.2018	MS	4	16
	Suma		4	16
Liść	16.04.2018	MS SK	7	35
		MS SK+A	0	0
	27.04.2018	MS SK	3	15
		MS SK+A	0	0
Łodyga	16.04.2018	MS SK	10	50
		MS SK+A	0	0
	27.04.2018	Suma obu poż.	10	50
		MS SK	7	35
		MS SK+A	0	0
	27.04.2018	MS SK	3	15

		MS SK+A	0	0
Działki okwiatu	Suma	MS SK	10	50
		MS SK+A	0	0
		Suma obu poż.	10	50
		MS SK	4	20
Łuska	Suma	MS SK+A	0	0
		MS SK	4	20
		MS SK+A	0	0
		Suma obu poż.	4	20
Piętka	Suma	MS SK	8	40
		MS SK+A	0	0
		MS SK	0	0
		MS SK+A	17	85
Suma	Suma	MS SK	8	40
		MS SK+A	17	85
		Suma obu poż.	25	125
		MS SK	3	15
Suma	Suma	MS SK+A	0	0
		MS SK	4	20
		MS SK+A	0	0
		MS SK	0	0
Suma	Suma	MS SK+A	3	15
		MS SK	7	35
		MS SK+A	3	15
		Suma obu poż.	10	50
Suma	Suma	MS SK	39	195
		MS SK+A	20	100
		MS	4	16
		Suma wszystkich poż.	63	311

Dodatkowo ze względu na różne rodzaje eksplantatów liściowych oraz łodygowych przygotowano w Tab. 3.12, zestawienie ilości założonych kultur i eksplantatów z uwzględnieniem różnych ich rodzajów.

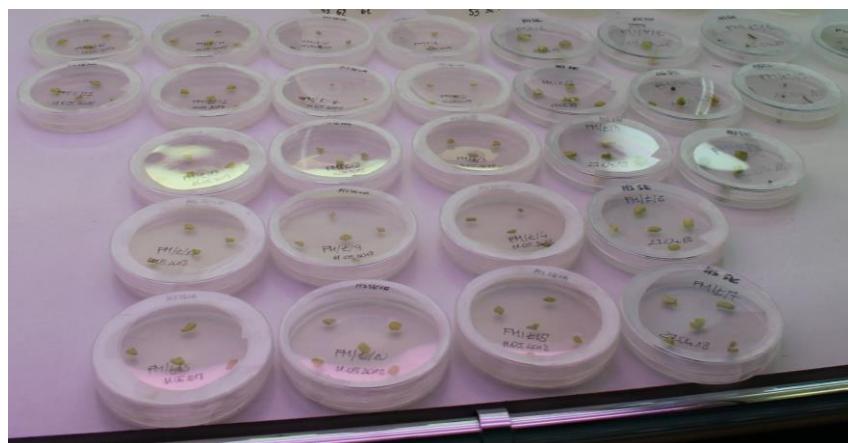
Tab. 3.12. Wykaz kultur założonych dla różnego rodzaju eksplantatu liściowego oraz łodygowego.

Źródło eksplantatu liściowego	Pożywka	Ilość kultur	Ilość eksplantatów
Liść – fragment kwadratowy	MSSK	8	40
Liść – fragment prostokątny	MSSK	2	10
Łodyga – przekrój podłużny	MSSK	10	29
Łodyga – przekrój poprzeczny	MSSK	7	21

3.2.2.5. Warunki prowadzenia kultury

W pierwszym etapie kultury były przechowywane w fitotronie, każda na półce bezpośrednio pod lampą –

Rys. 3.58.



Rys. 3.58. Kultury *Fritillaria meleagris* L. w fitotronie

W fitotronie panowała stała temperatura 21-22 stopnie Celsjusza, przy 16 godzinnej długości dnia oraz 8 godzinnej długości nocy. W przypadku kultur z nasionami, połowa z nich znajdowała się pod lampami a połowa w ciemni (szafie). Czas prowadzenia kultur dla pierwszego etapu wyniósł od 6 do 10 tygodni, pomijając kultury z nasionami dla, których okres ten wyniósł 16 tygodni. Szczegółowe informacje na temat czasu prowadzenia pierwszego etapu zebrano w Tab. 3.13.

Tab. 3.13. Czas prowadzenia pierwszego etapu.

Data założenia kultury	Data zakończenia I etapu	Czas prowadzenia kultury	
		dni	tygodnie
02.03.2018 (nasiona)	22.06.2018	113	16
16.04.2018		68	10
27.04.2018		57	8

11.05.2018		43	6
11.05.2018	29.06.2018	50	7

3.2.3. Etap II – namnażanie

Podczas doświadczenia etap namnażania został pominięty. Regeneraty otrzymane podczas etapu I mikrorozmnażania posłużyły jako baza do etapu III.

3.2.4. Etap III – rozwój i ukorzenianie regeneratów

Trzeci etap to jest rozwój i ukorzenianie regeneratów rozpoczął się 22.06.2018, i składał się z dwóch tur, pierwszej dnia 22.06.2018 oraz drugiej dnia 29.06.2018. Za materiał bazowy dla kultur w tym etapie posłużyły regeneraty otrzymane bezpośrednio po etapie I mikrorozmnażania stąd rozpoczęcie III etapu dla odpowiednich kultur było tożsame z zakończeniem dla nich etapu I. Etap II jak już wspomniano został pominięty.

3.2.4.1. Skład pożywek

Do III etapu dla *Fritillaria meleagris* L. użyto dokładnie takiej samej pożywki jak dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet dla etapu III. Jej skład jest dostępny w Tab. 3.6. Podobnie jak w przypadku śnieżycy karpackiej pożywkę wymieniano co 6 tygodni. W końcowej fazie III etapu ze względu na słaby wzrost regeneratów i ukorzenienie regeneratów zdecydowano się podobnie jak w przypadku śnieżycy na dodanie do pożywki regulatorów wzrostu – skład pożywki zastosowanej w końcowej fazie III etapu zestawiono w Tab. 3.7 w rozdziale dotyczącym *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

3.2.4.2. Opis kultur oraz numeracja regeneratów

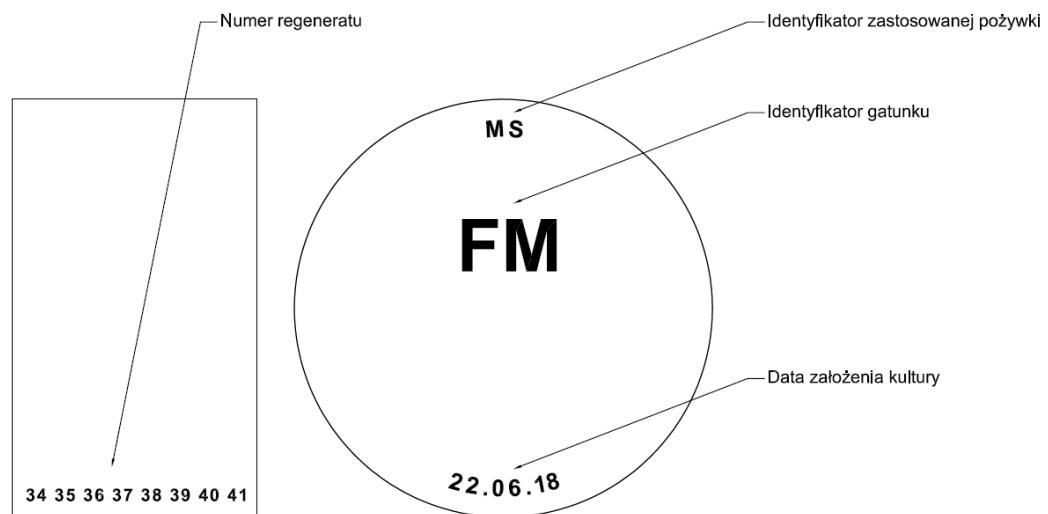
Kultyry zakładano w polietylowych pojemnikach w kształcie walca –

Rys. 3.59, dokładnie takich samych jak dla śnieżycy karpackiej.



Rys. 3.59. Pojemniki wykorzystane do prowadzenia kultur w III etapie mikrorozmnażania

Pożywka znajdowała się w dolnej części i stanowiła warstwę o grubości około 2 cm. Każdy z pojemników był opisany w sposób przedstawiony na Rys. 3.60. Opis znajdował się na wieczku oraz w dolnej części pojemnika. Ze względu na numerację regeneratów nie było potrzeby dodatkowego indeksowania pojemników. Na wieczku znajdowały się trzy identyfikatory (prawa strona Rys. 3.60), podobnie jak w przypadku oznaczeń szalek z pierwszego etapu.



Rys. 3.60. Sposób opisywania pojemników z *Fritillaria meleagris* L.

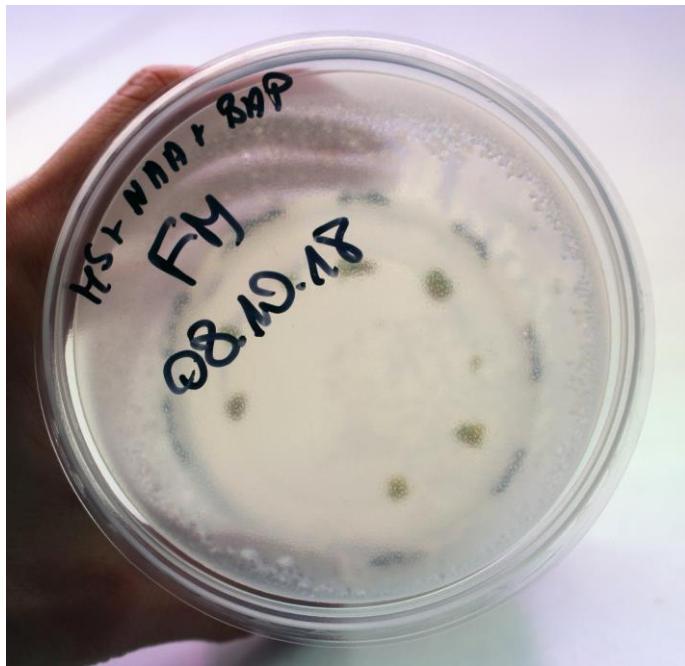
Pierwszym identyfikatorem był identyfikator zastosowanej pożywki umieszczony w górnej części wieczka pojemnika. Dla szachownicy kostkowej użyto w doświadczeniu dwóch rodzajów pożywek 'MS' –

Rys. 3.59 oraz 'MS + NAA + BAP' –

Rys. 3.61. Poprzez oznaczenie 'MS' należy rozumieć pożywkę bez dodatku regulatorów wzrostu – skład z Tab. 3.6, natomiast poprzez oznaczenie 'MS + NAA + BAP' należy rozumieć pożywkę wzbogaconą o regulatory wzrostu, NAA oraz BAP – skład z Tab. 3.7. Kolejnym oznaczeniem był identyfikator gatunku. Oznaczenie to znajdowało się w centralnej części wieczka pojemnika. Dla pojemników zawierających regeneraty *Fritillaria meleagris* L. jego wartość to 'FM'. Ostatnim oznaczeniem na pojemniku była data założenia kultury. Informacja ta, znajdowała się w dolnej części wieczka.

W dolnej części każdego pojemnika znajdował się numer regeneratu –

Rys. 3.59, lewa strona Rys. 3.60. Numeracja regeneratów nie była specyficzna dla danego pojemnika.



Rys. 3.61. Wieczko pojemnika z pożywką 'MS + NAA + BAP'

3.2.4.3. Sposób zakładania kultur i ich ilość

Do zakładania kultur użyto jedynie regeneratów, które nie nosiły śladów zakażeń czy zamierania. Wszystkie czynności związane z założeniem kultury wykonywano pod komorą laminarną. Każdy z regeneratów oczyszczono z resztek eksplantatu i lekko zagłębiono w pożywce. W przypadku regeneratów, które już posiadały korzenie, starano się zagłębić korzeń w pożywce.

W jednym pojemniku mogły znajdować się regeneraty pochodzące z różnych szalek. Każdy z regeneratów otrzymywał swój indeks pod którym umieszczano w notatkach informację na temat szalki (I etap) z której ów regenerat pochodził – notowano identyfikator szalki oraz datą założenia kultury w I etapie, co wystarczało do jednoznacznej identyfikacji. W jednym pojemniku umieszczono około 10 regeneratów. Łącznie założono 24 kultury do których założenia wykorzystano 231 regeneratów *Fritillaria meleagris L.* pochodzących z pierwszego etapu.

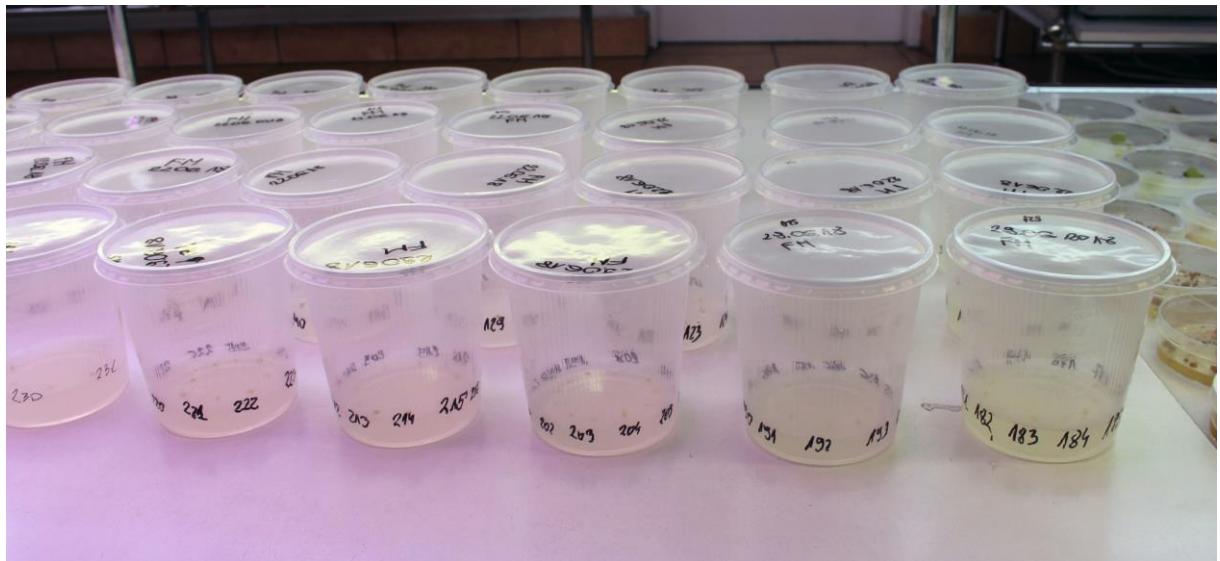
Zbiorczy wykaz regeneratów wykorzystanych do założenia III etapu zestawiono w Tab. 3.14. Szczegółowy wykaz regeneratów znajduje się w Załącznik 6.

Tab. 3.14. Zbiorczy wykaz regeneratów wykorzystanych do założenia III etapu.

Data założenia kultury	Data założenia szalki źródłowej	Oznaczenie szalki źródłowej	Numery regeneratów	Ilość regeneratów
22.06.2018	16.04.2018	FM/P/1	140-164	25
		FM/P/3	120-134	15
	27.04.2018	FM/Ł/1	77-119	43
		FM/Ł/2	60-76	17
		FM/Ł/3	135-139	5
		FM/Ł/7	165-175	11
		FM/Ł/11	52-59	8
	11.05.2018	FM/Ł/15	25-51	27
		FM/Ł/16	1-24	24
29.06.2018	11.05.2018	FM/Ł/1	229-231	3
		FM/Ł/2	199-210	12
		FM/Ł/3	211-218	8
		FM/Ł/4	226-228	3
		FM/Ł/5	176-180	5
		FM/Ł/8	181-198	18
		FM/Ł/9	224-225	2
		FM/Ł/14	219	1
		FM/Ł/17	220-223	4
Suma				231

3.2.4.4. Warunki prowadzenia kultury

W trzecim etapie mikrorozmnażania podobnie jak w pierwszym kultury były przechowywane w fitotronie, każda na półce bezpośrednio pod lampą – Rys. 3.62.



Rys. 3.62. Kultyry *Fritillaria meleagris* L. w fitotronie

W fitotronie panowała stała temperatura 21-22 stopnie Celsjusza, przy 16 godzinnej długości dnia oraz 8 godzinnej długości nocy. Pożywkę zmieniano na świeżą co około 6 tygodni. Etap zakończono dnia 14 grudnia 2018 roku. Czas prowadzenia kultur dla trzeciego etapu wyniósł od około 24 do 25 tygodni, z czego około 15-16 tygodni na pożywce bez regulatorów wzrostu oraz około 10 tygodni na pożywce zawierającej dodatek NAA oraz BAP. Szczegółowe informacje na temat czasu prowadzenia trzeciego etapu zebrano w Tab. 3.15.

Tab. 3.15. Czas prowadzenia trzeciego etapu dla *Fritillaria meleagris* L.

Data założenia kultury	Data przejścia na 'MS + NAA + BAP'	Data zakończenia III etapu	Czas prowadzenia kultury					
			Pożywka 'MS'		Pożywka 'MS + NAA + BAP'		Sumarycznie	
			dni	tyg	dni	tyg	dni	tyg
22.06.2018	08.10.2018	14.12.2018	109	16	68	10	177	25
29.06.2018			102	15	68	10	170	24

3.2.5. Etap IV – aklimatyzacja

Ze względu na słaby rozwój regeneratów w etapie III i ich niedostateczną wielkość do etapu IV, doświadczenie zostało zakończone na etapie III.

3.2.6. Badanie żywotności pyłku

Jak wspomniano w rozdziale 2.2.5 główną przyczyną tego iż *Fritillaria meleagris* L. jest gatunkiem rzadkim jest fakt jej związania z specyficzny rodzajem siedlisk, to jest podmokłych łąk, które często są obecnie osuszane. Zdecydowano się jednak wykonać dodatkowe mikrodoświadczenie, które pozwoliłoby sprawdzić czy inne czynniki takie jak np. żywotność pyłku, nie mają również negatywnego wpływu na częstość występowania tego gatunku.

Badanie żywotności pyłku *Fritillaria meleagris* L. wykonano dwoma metodami, identycznie jak dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet z wykorzystaniem barwnika Aleksandra oraz z wykorzystaniem acetokarmelu –

Rys. 3.30.

Doświadczenie odbyło się według następującej procedury:

1. Pobranie pylników z roślin za pomocą pęsety. Pobrane pylniki umieszczone na fragmencie papieru.
2. Za pomocą pęsety wysypano pyłek na szkiełko podstawowe i zalano pyłek dwoma kroplami barwnika.
3. Następnie nałożono szkiełko nakrywkowe. Przygotowano po dwa preparaty dla każdego rodzaju barwnika co dało łącznie cztery preparaty.
4. Odczekano 15 minut.
5. Dla każdego z preparatów sprawdzono pod mikroskopem stan żywotności co najmniej 300 ziaren pyłku. Obserwację pod mikroskopem prowadzono z wykorzystaniem obiektywu 40x oraz okularów o powięszeniu 10x. Dla każdego pola widzenia zanotowano ilość żywych i martwych ziaren pyłku.

Wyniki doświadczenia przedstawiono i omówiono w rozdziale 4.6.

4. WYNIKI ORAZ DYSKUSJA

4.1. Zakażenia w doświadczeniu

Zakażenia w prowadzonym doświadczeniu były dużym problemem. Występowały przy obu gatunkach, zarówno w kulturach *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet jak i *Fritillaria meleagris* L. Występowały one głównie podczas I etapu rozmnażania, jednakże pojawiały się również kilkukrotnie podczas III etapu. Głównym źródłem zakażeń były same eksplantaty, jednakże kilkukrotnie zdążyło się również, że źródłem zakażenia była nieszczelna szalka, czy nieodpowiednia praca pod komorą laminarną. Występowały zakażenia pochodzenia bakteryjnego jak i grzybowego. Nie podjęto się oznaczania konkretnych gatunków będących źródłem zakażania. W przypadku przezroczystego lub nieprzejrzystego wysięku bez widocznej plechy przyjmowano, że jest to zakażenie bakteryjne, w przypadku widocznej plechy zakażenie klasyfikowano jako grzybowe. W niniejszym rozdziale zawarto dokumentacje fotograficzną zakażeń, podsumowanie ilości zakażeń oraz ocenę skuteczności modyfikacji metodyki badań, które miały na celu ograniczenie ilości zakażeń.

4.1.1. Zakażenia w kulturach *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet – dokumentacja fotograficzna

W przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet występowały zarówno zakażenia bakteryjne jak i grzybowe. Występowały one w kulturach pochodzących od różnego rodzaju eksplantatów.

W przypadku zakażeń bakteryjnych było kilka ich typów. Jednym z nich były wodniste plamy tworzące się wokół eksplantatu. Plamy te stopniowo powiększały się i rozlewały po większej części pożywki. Tego typu zakażenie bakteryjne występowało zarówno w kulturach z eksplantatami pochodzenia liściowego, łuskowego jak i w przypadku kultur pochodzących od piętki –

Rys. 4.1,

Rys. 4.2.



Rys. 4.1 Wodniste zakażenia bakteryjne u eksplantatów liściowych, łuskowych i piętkowych

W przypadku zakażeń bakteryjnych występowały również zakażenia o nieprzejrzystej jednolitej barwie –

Rys. 4.3,

Rys. 4.4 jak i takie z pierścieniowym układem barw –

Rys. 4.5. Zdarzały się również kultury z wieloma zakażeniami różnych typów –Rys. 4.6.

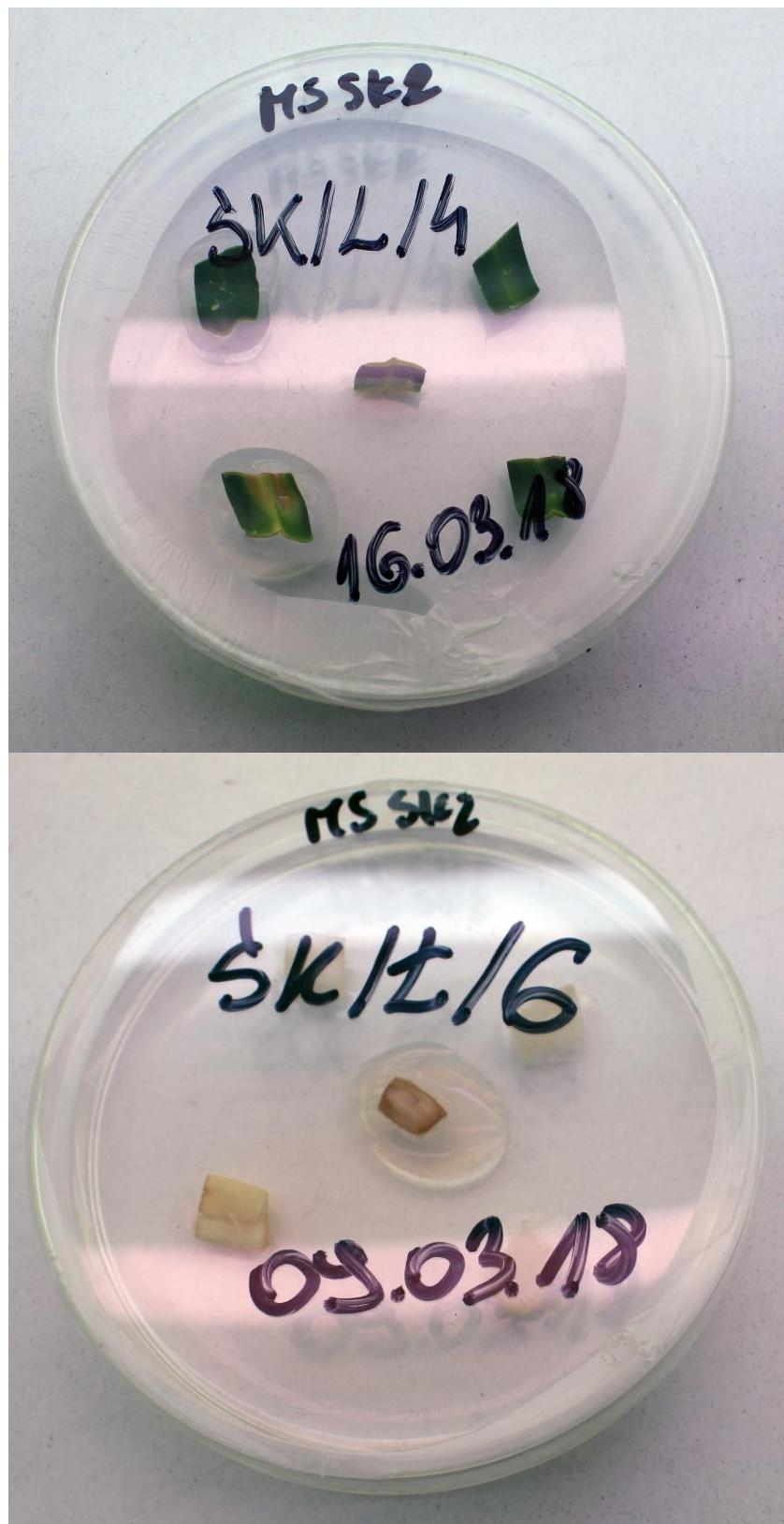
Na

Rys. 4.7 oraz

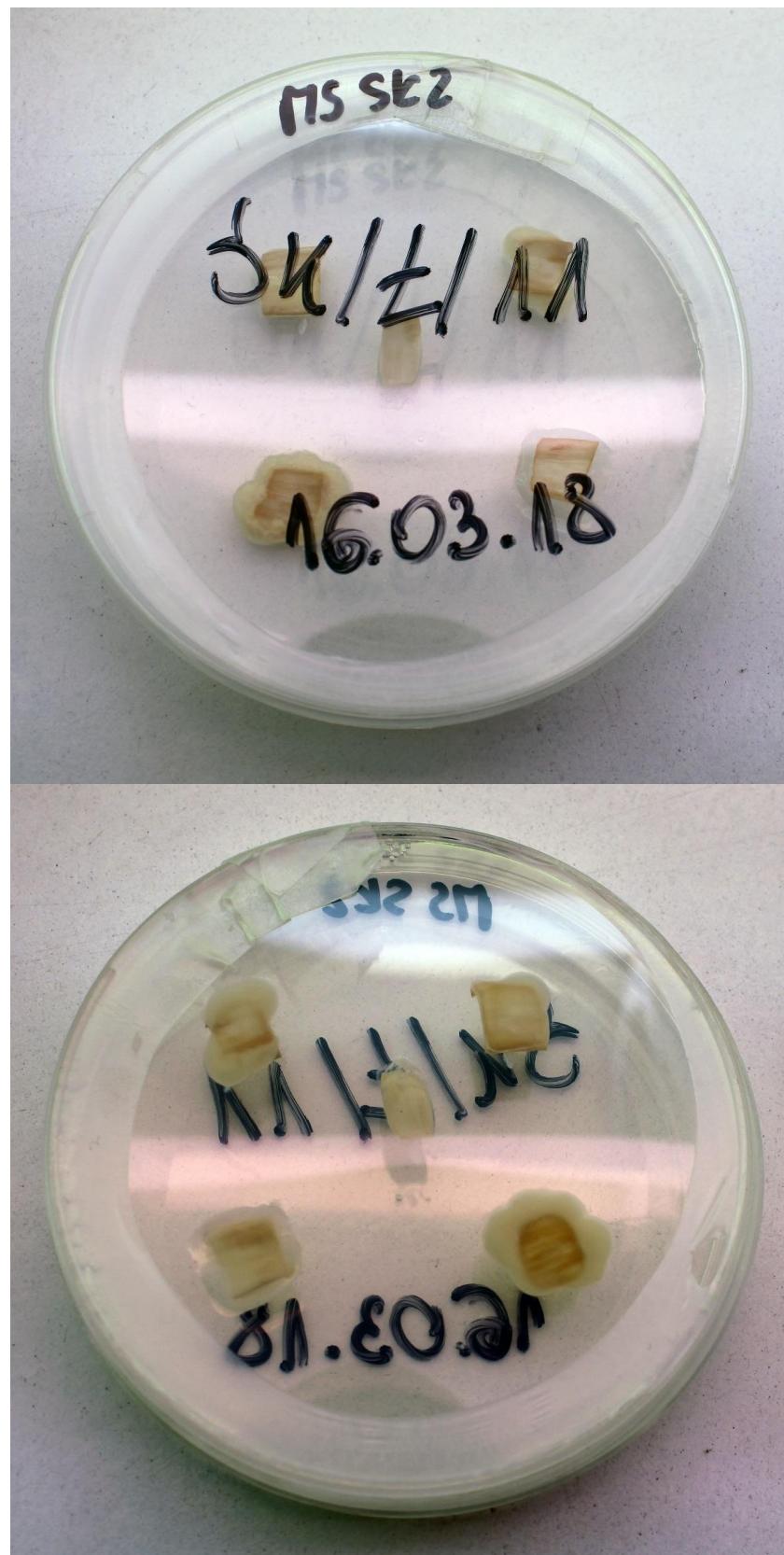
Rys. 4.8 przedstawiono kultury z zakażeniami grzybowymi. W przypadku

Rys. 4.7 zakażenie pochodzi prawdopodobnie od eksplantatu, natomiast w przypadku

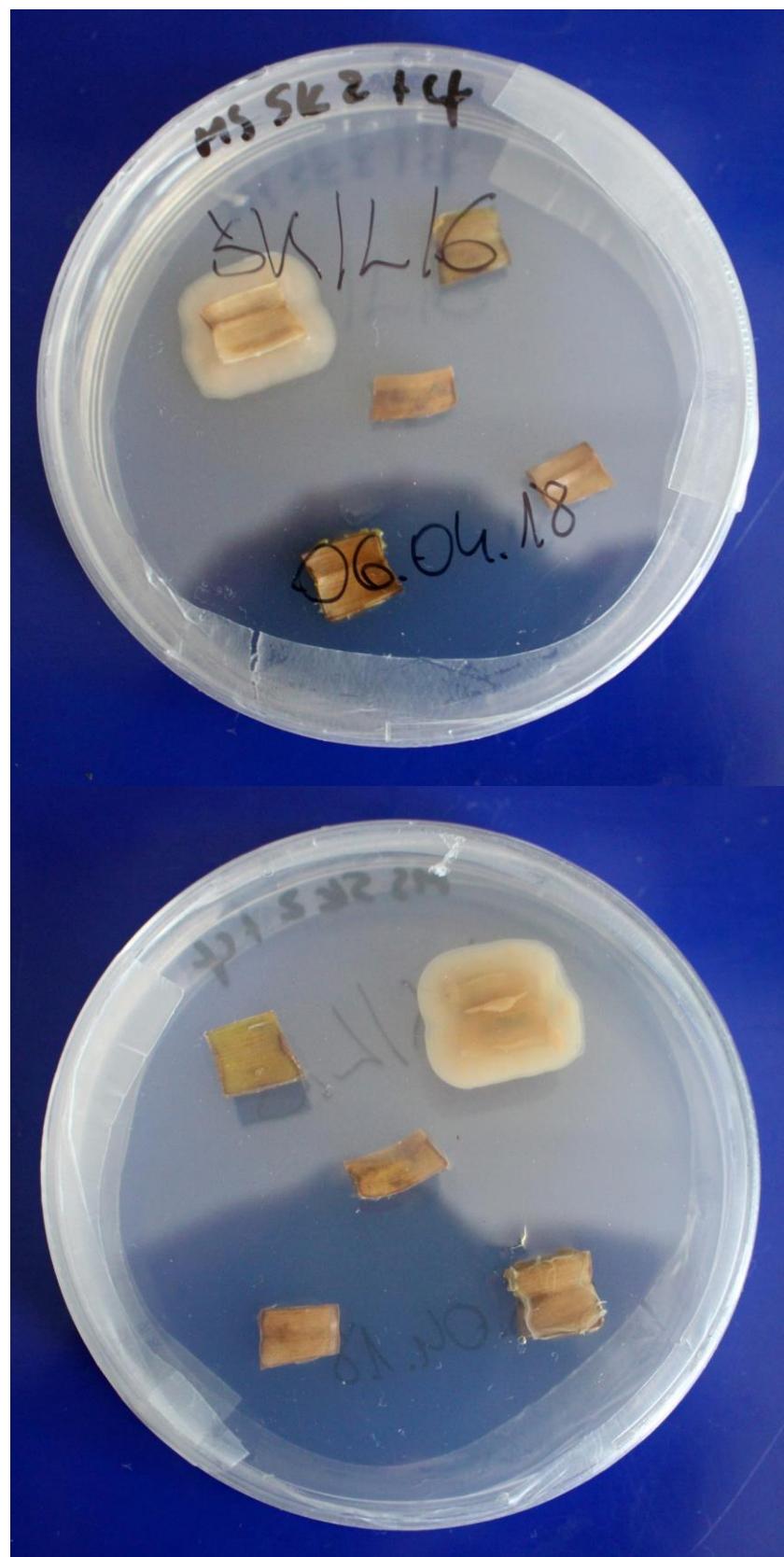
Rys. 4.8 jest prawdopodobnie wynikiem nieszczelności szalki – słabego zabezpieczenia rantu.



Rys. 4.2 Kultury z wodnistymi zakażeniami bakteryjnymi, kultura liściowa (u góry) i łuskowa (u dołu)



Rys. 4.3 Kultura z nieprzejrzystymi jednolitymi zakażeniami bakteryjnymi – kultura łuskowa



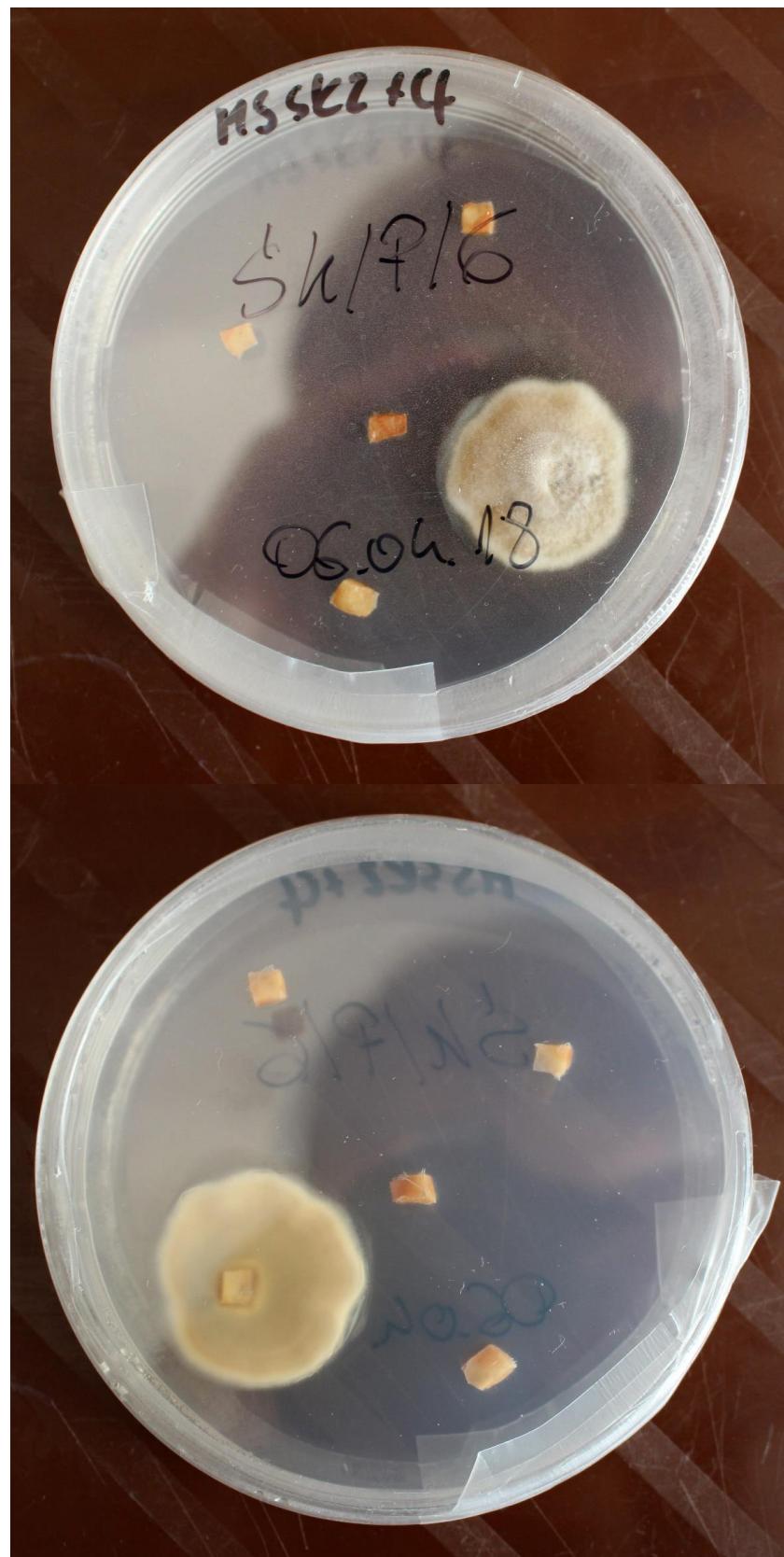
Rys. 4.4 Kultura z nieprzejrzystym jednolitym zakażeniem bakteryjnym – kultura liściowa



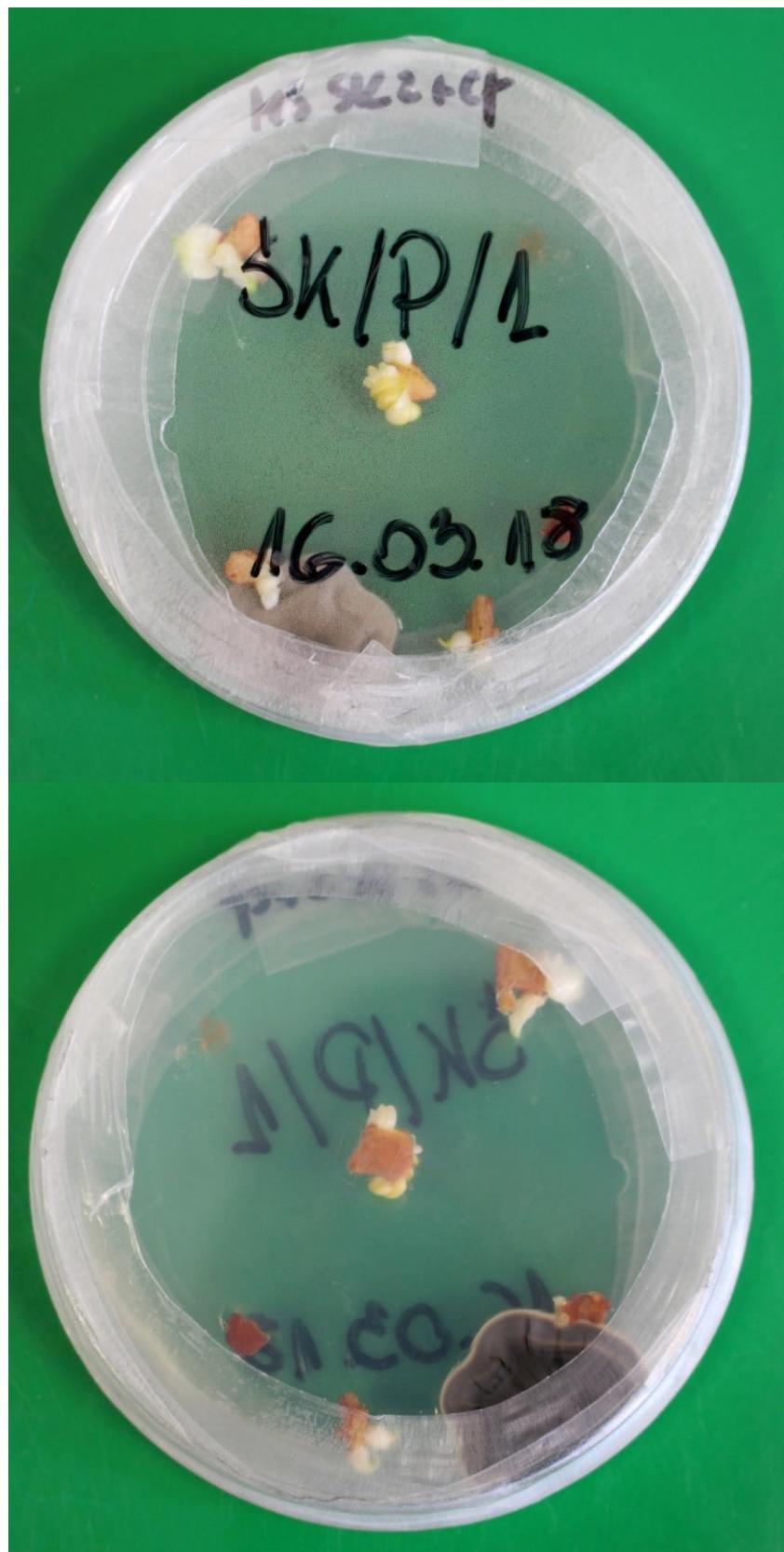
Rys. 4.5 Kultura z nieprzejrzystym pierścieniowym zakażeniem bakteryjnym – kultura piętkowa



Rys. 4.6 Kultura z wieloma różnymi zakażeniami bakteryjnymi – kultura łuskowa



Rys. 4.7 Kultura z zakażaniem grzybowym – kultura piętkowa



Rys. 4.8 Kultury z zakażeniem grzybowym pochodzący od nieszczelności szalki

4.1.2. Zakażenia w kulturach *Fritillaria meleagris* L. – dokumentacja fotograficzna

W przypadku *Fritillaria meleagris* L. również występowały zakażenia bakteryjne oraz grzybowe. Część zakażeń miało cechy zarówno zakażenia bakteryjnego jak i grzybowego na przykład gruba pajęczynka na powierzchni pożywki –

Rys. 4.10. W przypadku zakażeń bakteryjnych występowały podobnie jak dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet zakażenia o charakterze wodnistych, przejrzystych mazi –

Rys. 4.9 jak i nieprzejrzystych jednobarwnych plam wokół eksplantatu –

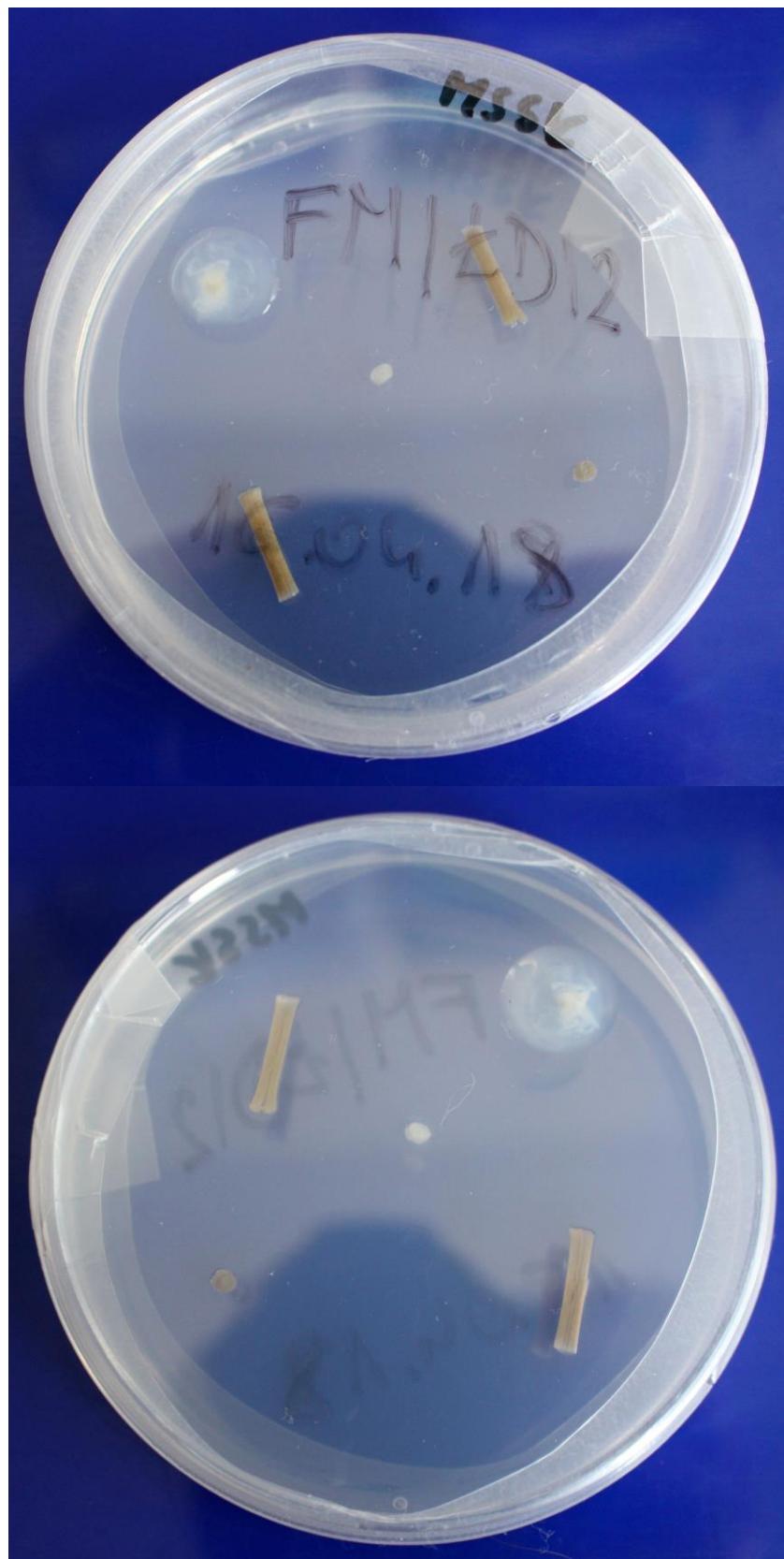
Rys. 4.11. Bywały kultury w których występowały jednocześnie dwa różne zakażenia bakteryjne –

Rys. 4.12 gdzie mamy do czynienia z plamą wokół eksplantatu białą od góry gdzie nie było styku z pożywką i żółtą od spodu szlaki gdzie stykała się z pożywką oraz plamą o jednolitym cielistym kolorze zarówno od góry jak i od dołu.

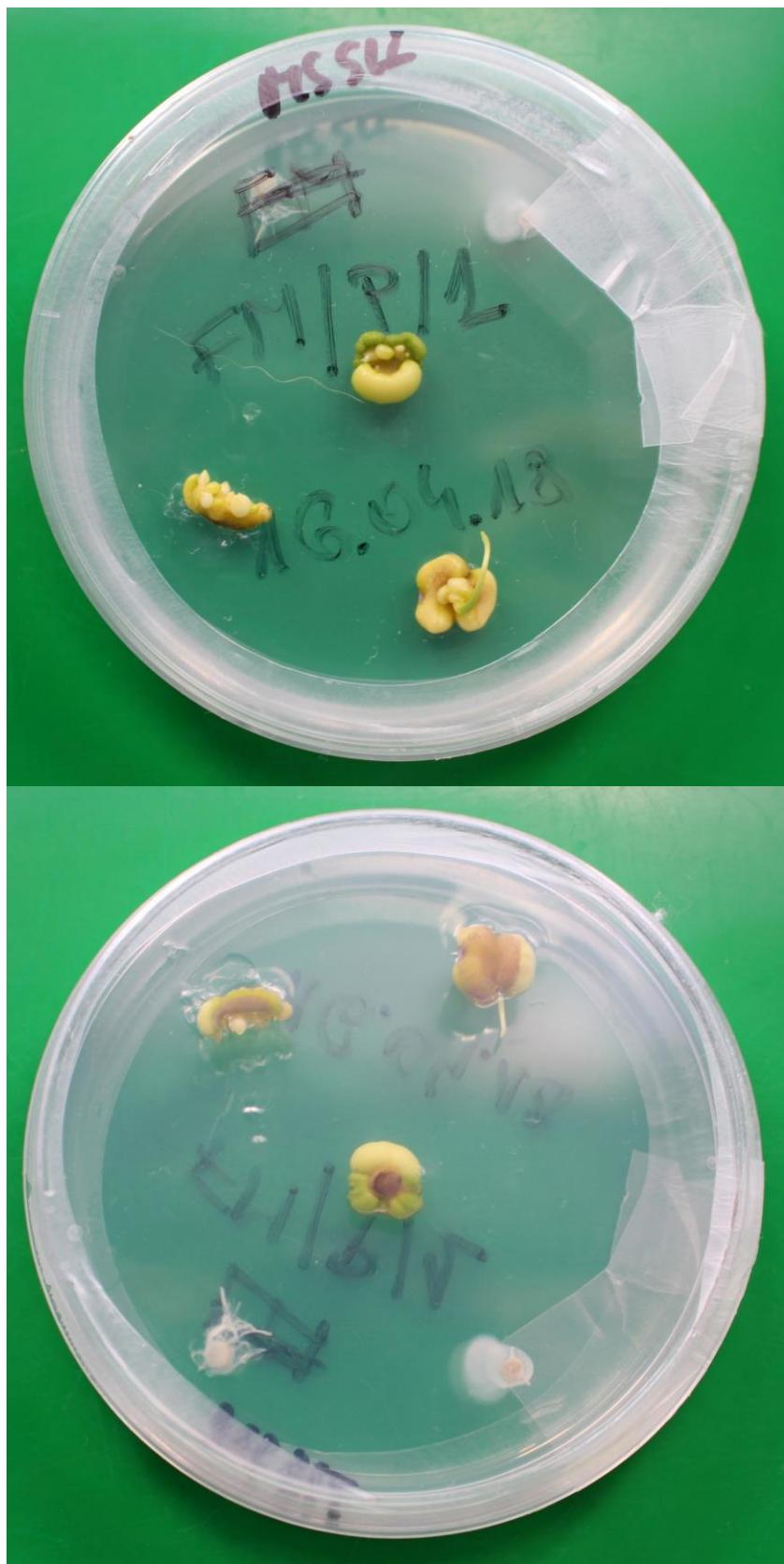
Zakażenia grzybowe zostały przedstawione na

Rys. 4.13 oraz

Rys. 4.14. Miały postać współśrodkowych różnokolorowych okręgów z widoczną plechą. Zdarzały się również kultury ze znacznym zakażeniem grzybowym, które objęło całą powierzchnię szalki – Rys. 4.15.



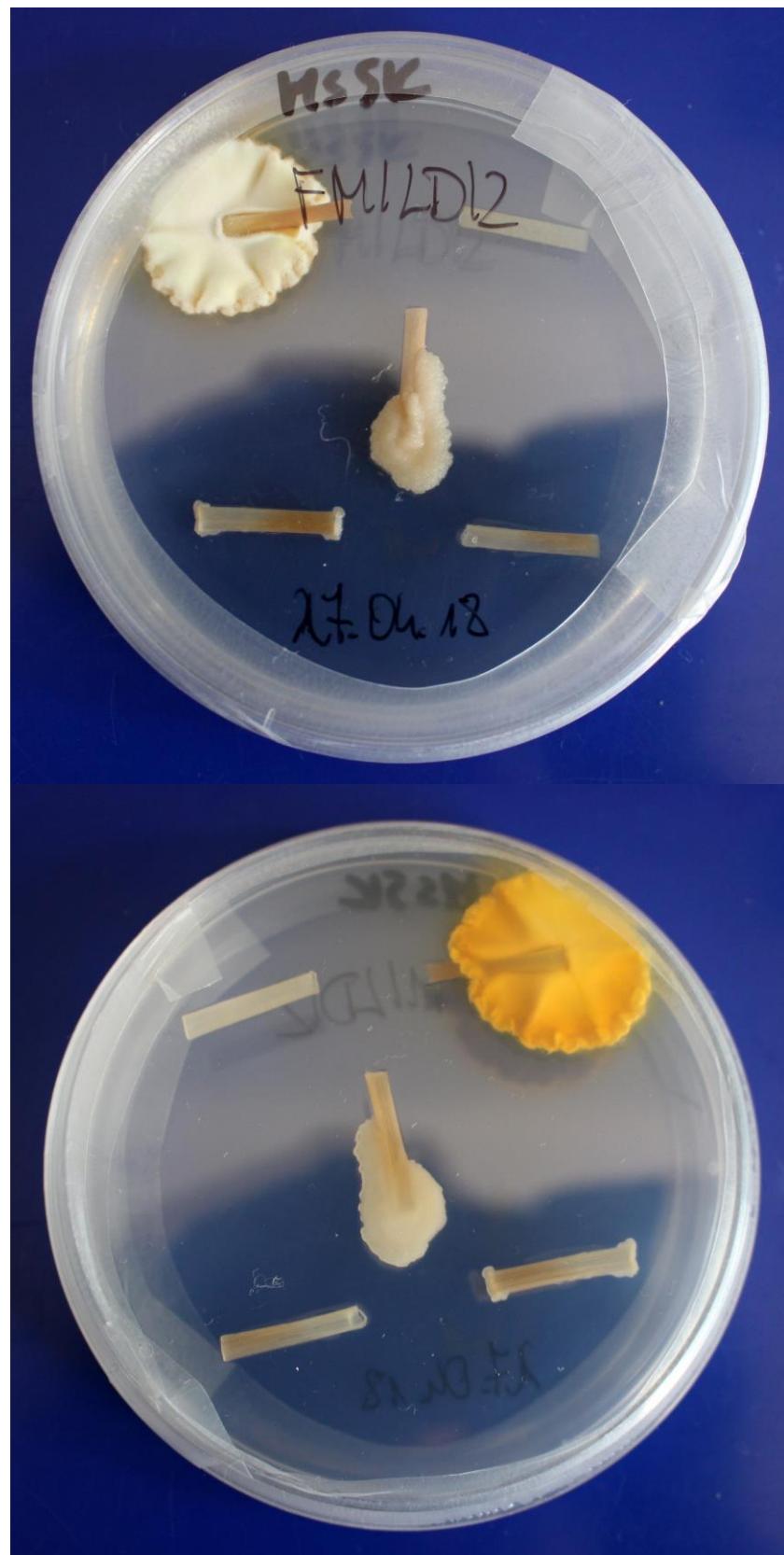
Rys. 4.9 Wodnistе zakażenie bakteryjne – kultura łodygowa



Rys. 4.10 Zakażenia nieznanego pochodzenia – kultura piętkowa



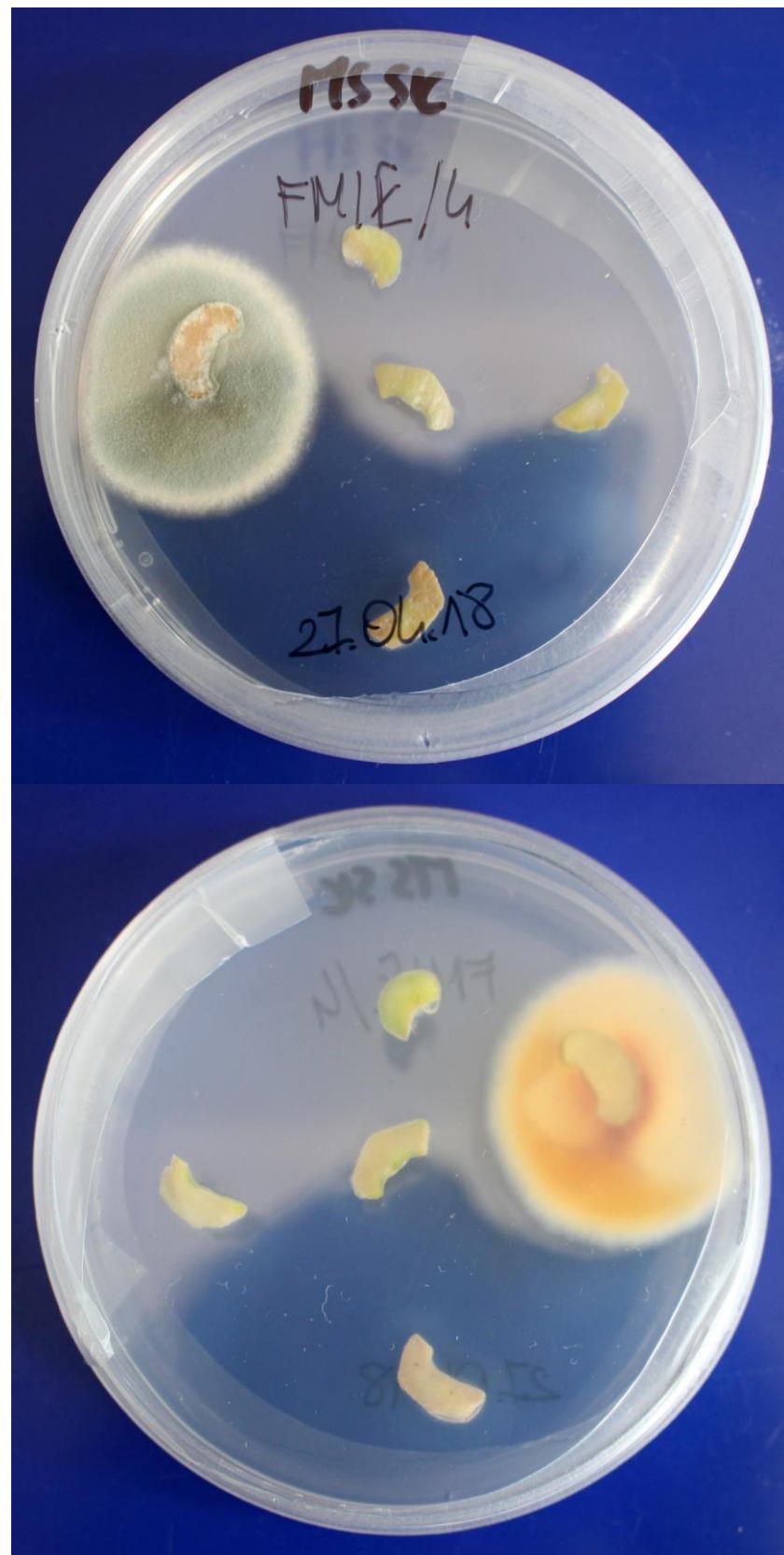
Rys. 4.11 Nieprzezroczyste jednolite zakażanie bakteryjne – kultura łodygowa



Rys. 4.12 Dwa różna zakażenia bakteryjne – kultura łydgową



Rys. 4.13 Zakażenie grzybowe – kultura piętkowa



Rys. 4.14 Zakażenie grzybowe – kultura łuskowa

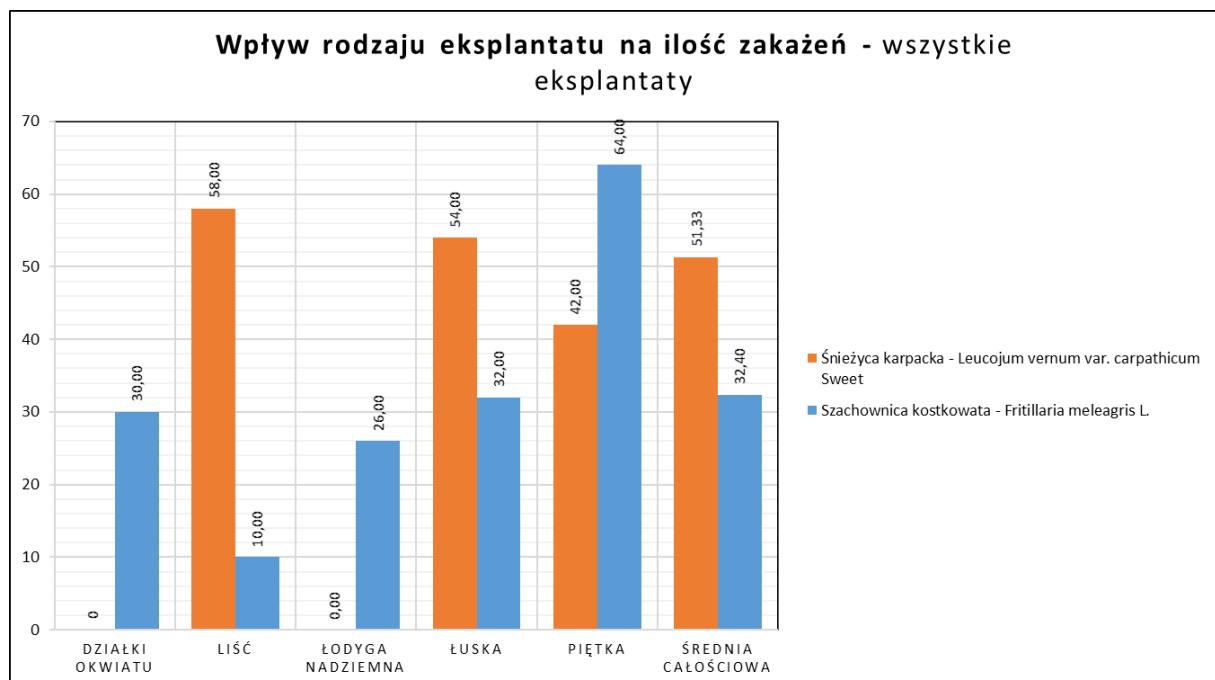


Rys. 4.15 Różne zakażenia grzybowe które oponowały całą kulturę

4.1.3. Ilość zakażeń oraz wpływ rodzaju eksplantatu na ilość zakażeń

Zbiorcze podsumowanie ilości zakażeń dla obu gatunków zebrano w Tab. 4.1, natomiast szczegółowe dane pochodzące z obserwacji przedstawiono w Załącznik 7 dla śnieżycy karpackiej oraz Załącznik 8 dla szachownicy kostkowej.

Zakażenia okazały się większym problemem w przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, gdzie średnia ilość zakażeń przy 450 wyłożonych eksplantatach wyniosła aż 51,33%. Dla śnieżycy karpackiej nieco bardziej problematyczne pod względem ilości zakażeń okazały się eksplantaty pochodzące z nadziemnej części rośliny – tutaj liści. Procent zakażeń dla eksplantatów liściowych wyniósł 58,00%. Nieznacznie mniejsza ilość zakażeń wystąpiła w przypadku eksplantatów pochodzących od organów odziemnych, łusek spichrzowych 54,00% oraz eksplantatów pochodzących z piętki – 42,00%. Zestawienie ilości zakażeń w zależności od rodzaju eksplantatu przedstawiono w postaci wykresu kolumnowego na



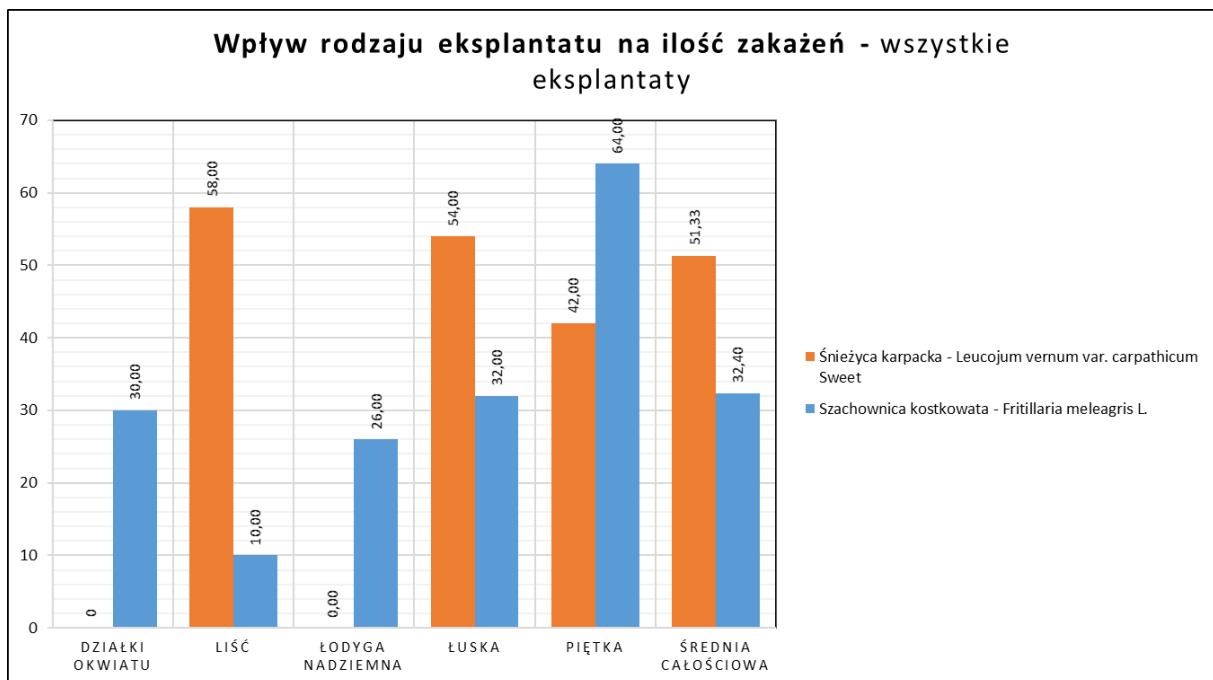
Rys. 4.16 – kolorem pomarańczowym dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

Tab. 4.1 Ilość zakażeń w kulturach obu gatunków.

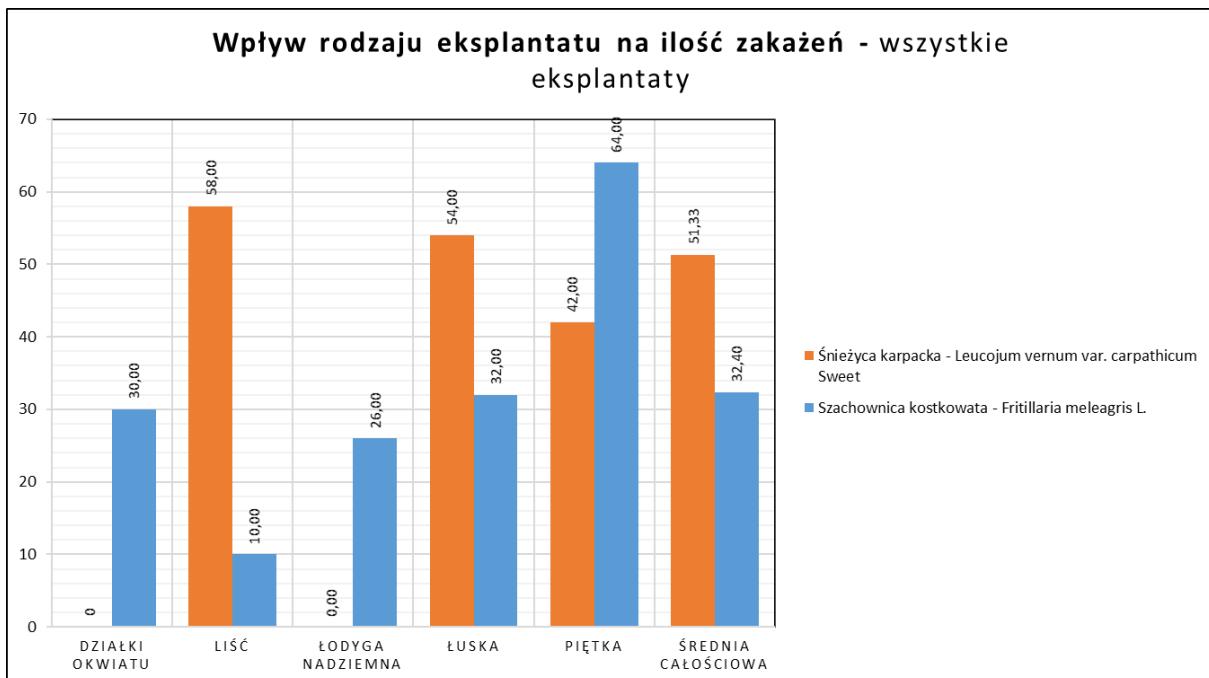
Gatunek	Źródło eksplantatu	Ilość wyłożonych eksplantatów [a]	Ilość eksplantatów bez zakażeń [b]	Ilość eksplantatów z zakażeniami [c]	Procent zakażeń [d]
Śnieżycę karpacką - <i>Leucojum vernum</i> var.	Liść	150	63	87	58,00
	Łuska	150	69	81	54,00
	Piętka	150	87	63	42,00

<i>carpathicum</i> Sweet	Średnia całościowa	51,33			
	Średnia łuska+piętki	48,00			
Szachownica kostkowata - <i>Fritillaria meleagris</i> L.	Działki okwiatu	20	14	6	30,00
	Liść	50	45	5	10,00
	Łodyga nadziemna	50	37	13	26,00
	Łuska	125	85	40	32,00
	Piętka	50	18	32	64,00
	Średnia całościowa	32,40			
	Średnia łuska+piętki	48,00			

W przypadku *Fritillaria meleagris* L. średnia ilość zakażeń dla 295 wyłożonych eksplantatów wyniosła 32,40%. Jest to wartość niższa niż w przypadku śnieżycy karpackiej ale wciąż stanowi niemal jedną trzecią wyłożonych eksplantatów. Odwrotnie niż w przypadku śnieżycy, zakażenia dla szachownicy kostkowej były wyższe dla eksplantatów pochodzących od organów podziemnych 48,00% (łuski spichrzowe 32,00% oraz piętka 64,00%). W przypadku eksplantatów pochodzących od organów nadziemnych ilość zakażeń kształtowała się na poziomie 22,00% (działki okwiatu 30,00%, liści 10,00%, łodyga nadziemna 26,00%). Należy jednak zaznaczyć, że ilość wyłożonych eksplantatów była w przypadku części nadziemnych stosunkowo mała, co mogło wprowadzić pewien błąd. Dodatkowo ważnym jest, że eksplantaty pochodzące od części nadziemnych *Fritillaria meleagris* L., szybko zamarły. Dlatego też wyników tych nie powinno się brać jako rozstrzygających. Zestawienie ilości zakażeń w zależności od rodzaju eksplantatu przedstawiono w postaci wykresu kolumnowego na



Rys. 4.16 – kolorem niebieskim dla *Fritillaria meleagris* L.

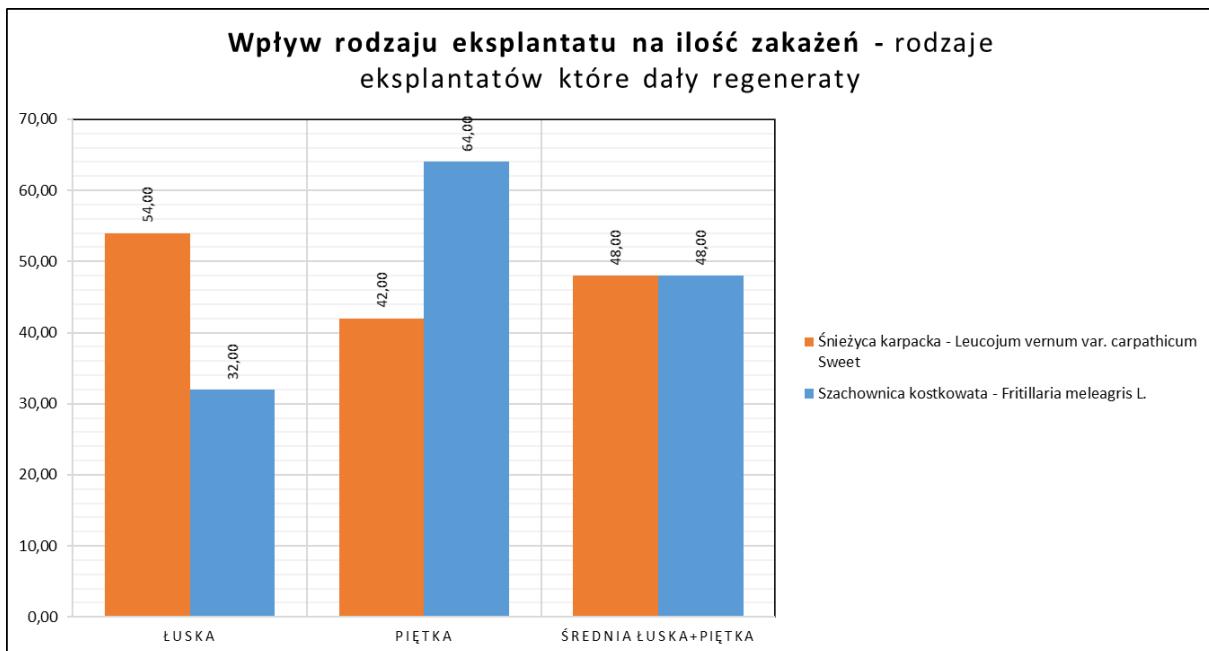


Rys. 4.16 Wpływ rodzaju eksplantatu na ilość zakażeń – wszystkie eksplantaty

Biorąc pod uwagę całociową ilość wyłożonych eksplantatów, lepiej pod względem zakażeń wypada szachownica kostkowata. Ze względu na powody zaznaczone w powyższym akapicie, zdecydowano się jednak na wykonanie jeszcze jednego zestawienia. Na wykresie kolumnowym przedstawionym na Rys. 4.17 wzięto pod uwagę jedynie eksplantaty tego rodzaju, które podjęły aktywność regeneracyjną – dla obu gatunków były to eksplantaty pochodzące od łuski spichrzowej oraz piętki.

W zestawieniu tym okazuje się, że w przypadku obu gatunków średnia ilość zakażeń była dokładnie taka sama i wyniosła 48,00%. Dodatkowo warto zauważyć, że w przypadku eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej odkażanie było skuteczniejsze dla szachownicy kostkowanej (54,00% zakażeń u śnieżycy oraz 32,00% zakażeń u szachownicy), natomiast w przypadku eksplantatów pochodzących z piętki sytuacja jest odwrotna (42,00% zakażeń u śnieżycy oraz 64,00% zakażeń u szachownicy).

Tak wysoka ilość zakażeń pokazuje jak dużym wyzwaniem jest otrzymanie aseptycznej kultury z materiału roślinnego pochodzącego z środowiska naturalnego (szczególnie w przypadku gatunków związanych z środowiskiem podmokłym) oraz daje spore pole do dalszych doświadczeń w zakresie dopracowania metod odkażania dla obu badanych gatunków.



Rys. 4.17 Wpływ rodzaju eksplantatu na ilość zakażeń – rodzaje eksplantatów które dały regeneraty

W publikacji [17] uzyskano ograniczenie liczby zakażeń do 17,12% w przypadku eksplantatów liściowych pochodzących od śnieżycy letniej. Jest to wynik znacznie lepszy niż uzyskany dla podobnego typu eksplantatu w przypadku śnieżycy karpackiej oraz nieco gorszy niż w przypadku szachownicy kostkowej. Ze względu na różnice gatunkowe, trudno jednak stwierdzić czy zastosowana w publikacji metoda miała tutaj decydujący wpływ na ograniczenie ilości zakażeń. W celu potwierdzenia lub obalenia tej hipotezy konieczne byłyby dodatkowe doświadczenia. W publikacji zaznaczono również, że ilość zakażeń dla części podziemnych rośliny jest większa niż dla części nadziemnych. Sytuacja w niniejszym doświadczeniu była podobna dla szachownicy kostkowej i odwrotna dla śnieżycy karpackiej.

4.1.4. Wpływ dodatku antybiotyku w pożywce na ilość zakażeń

Ze względu na dużą ilość zakażeń w początkowym etapie doświadczenia zdecydowano się na kilka modyfikacji mających na celu obniżenie sumarycznej zakażeń. Jedną z tych modyfikacji było wzbogacenie pożywki dodatkiem antybiotyku – cefotaksymu. Modyfikację tą zastosowano dla obu badanych gatunków. W Tab. 4.2 zebrano zbiorcze zestawienie dotyczące wpływu tej modyfikacji na ilość zakażeń dla obu gatunków.

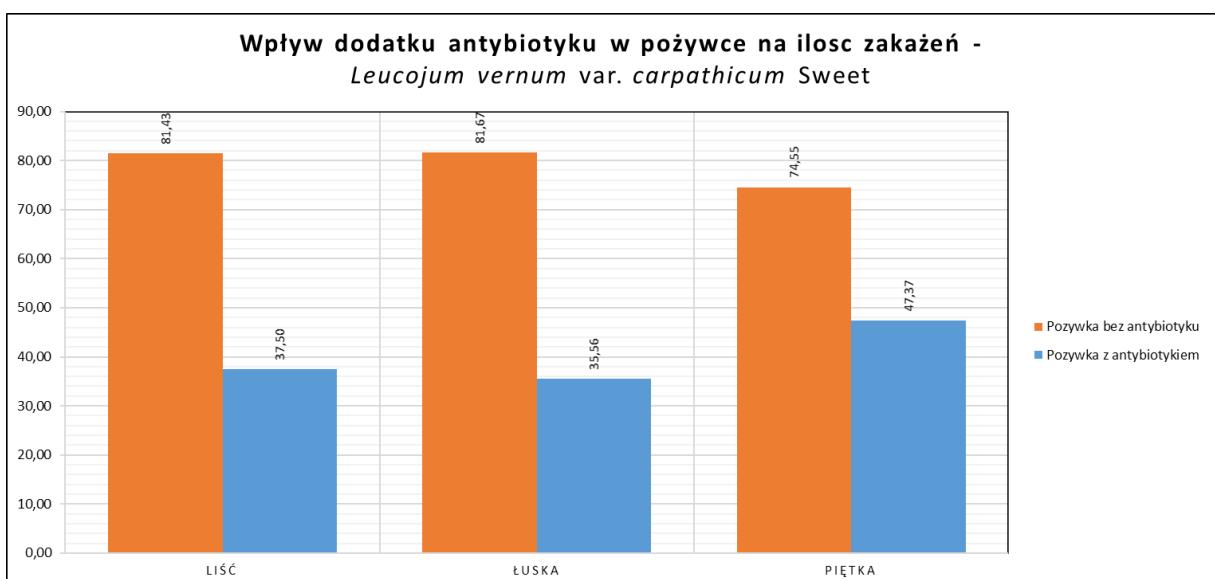
Tab. 4.2. Wpływ dodatku antybiotyku w pożywce na ilość zakażeń.

Gatunek	Źródło eksplantatu	Ilość wyłożonych eksplantatów [a]	Ilość eksplantatów bez zakażeń [b]	Ilość eksplantatów z zakażeniami [c]	Procent zakażeń [d]
Pożywka bez antybiotyku					
Śnieżyca karpacka	Liść	70	13	57	81,43
	Łuska	60	11	49	81,67
	Piętka	55	14	41	74,55
Szachownica kostkowata	Działki okwiatu	20	14	6	30,00
	Liść	50	45	5	10,00
	Łodyga nadziemna	50	37	13	26,00
	Łuska	40	23	17	42,50
	Piętka	35	18	17	48,57
Pożywka z antybiotykiem					
Śnieżyca karpacka	Liść	80	50	30	37,50
	Łuska	90	58	32	35,56
	Piętka	95	50	45	47,37
Szachownica kostkowata	Działki okwiatu	0	0	0	0,00
	Liść	0	0	0	0,00
	Łodyga nadziemna	0	0	0	0,00
	Łuska	85	62	23	27,06
	Piętka	15	0	15	100,00
Wpływ dodatku antybiotyku na ograniczenie ilości zakażeń [%]					
Śnieżyca karpacka	Liść			– 43,93	
	Łuska			– 46,11	
	Piętka			– 27,18	
Szachownica kostkowata	Działki okwiatu			nd	

Liść	nd
Łodyga nadziemna	nd
Łuska	- 15,44
Piętka	+ 51,43

Dane dla śnieżycy karpackiej zwizualizowano w postaci wykresu kolumnowego przedstawionego na

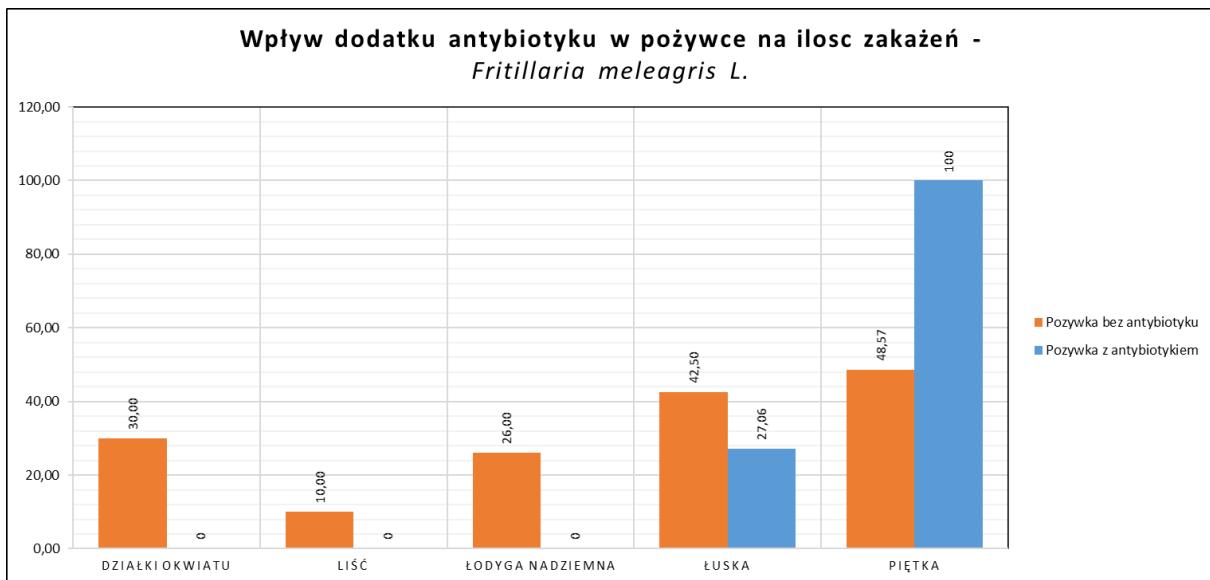
Rys. 4.18. W przypadku tego gatunku odnotowano znaczącą skuteczność tej modyfikacji. Dla eksplantów pochodzących od liścia odnotowano spadek liczby zakażeń o 43,93%, dla eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej o 46,11% oraz 27,18% dla piętki. Stąd też można stwierdzić, że dodatek antybiotyku w pożywce w znaczący sposób ograniczył ilość zakażeń w przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.



Rys. 4.18 Wpływ dodatku antybiotyku w pożywce na ilość zakażeń – *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Dane dla szachownicy kostkowej dane zwizualizowano na wykresie kolumnowym przedstawionym na

Rys. 4.19. W przypadku szachownicy kostkowej pożywkę z antybiotykiem zastosowano jedynie dla eksplantów pochodzących z łusek liściowych oraz piętki (jedynie te eksplantaty po pierwszej turze zakładania kultur wykazywały jakikolwiek rozwój). Dla eksplantów pochodzących z łuski spichrzowej odnotowano spadek zakażeń o 15,44% w stosunku do pożywki bez dodatku antybiotyku. W przypadku eksplantatów pochodzących z piętki dane pokazują iż dodatek antybiotyku przyniósł efekt odwrotny do zamierzonego – 100% eksplantatów na pożywce z dodatkiem antybiotyku uległo zakażeniu. Ze względu na bardzo małą ilość założonych kultur, 15 eksplantatów (oznacza to, że założono jedynie 3 kultury), należy ten wynik uznać za błąd gruby i odrzucić.



Rys. 4.19 Wpływ dodatku antybiotyku w pożywce na ilość zakażeń – *Fritillaria meleagris L.*

Sumarycznie należy uznać, że dodatek antybiotyku w pożywce przyniósł pozytywny efekt w przypadku obu gatunków i można go polecić jako skuteczny sposób ograniczania ilości zakażeń w przypadku roślin gatunków *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet oraz *Fritillaria meleagris* L. pochodzących z środowiska naturalnego.

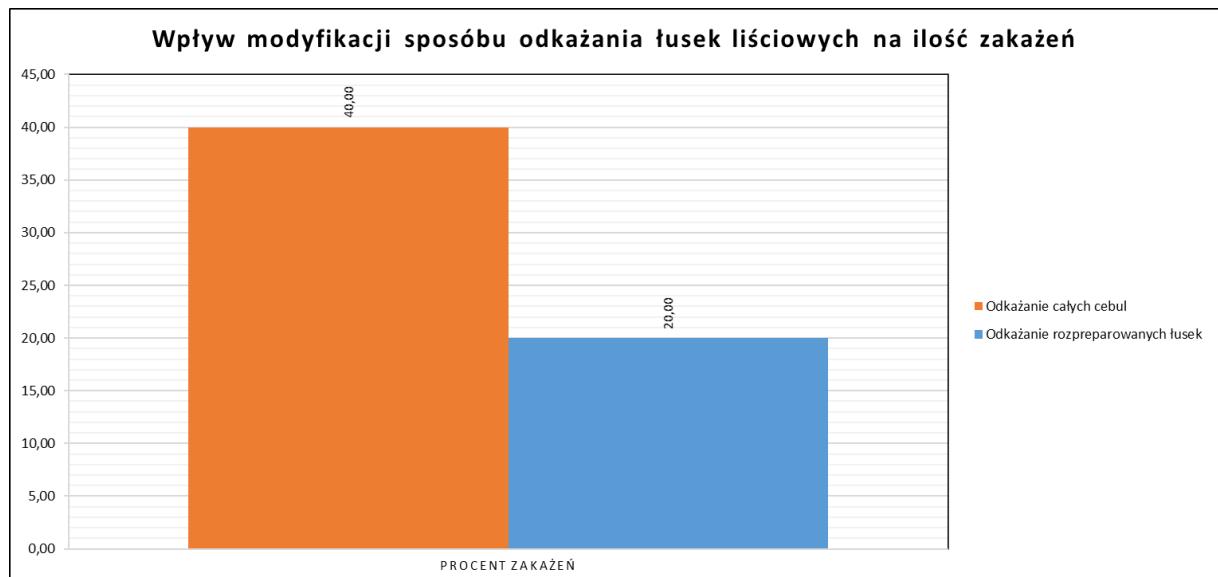
4.1.5. Wpływ modyfikacji metody odkażania łusek liściowych u *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet na ilość zakażeń

W przypadku śnieżycy karpackiej zdecydowano się na dodatkowe doświadczenie z modyfikacją sposobu odkażania łusek liściowych. Zamiast odkażania całych cebul i izolowania łusek z odkażonych już cebul, zdecydowano się wyizolować łuski jeszcze przed odkażaniem. Dzięki temu, każda z łusek z której zostały wykonane eksplantaty miała bezpośredni kontakt z czynnikami odkażającymi. Wszystkie kultury zawierające eksplantaty z modyfikacją sposobu odkażania zawierały pożywkę z dodatkiem antybiotyku 'MS SK2+CF'. Otrzymane wyniki porównano więc jedynie z tymi kulturami na których również zastosowano pożywkę 'MS SK2+CF' aby nie wprowadzać do wyników dodatkowego błędu związanego z rodzajem pożywki. Dane z doświadczenia zebrano w Tab. 4.3 oraz zwizualizowano na Rys. 4.20.

Tab. 4.3. Wpływ modyfikacji metody odkażania łusek liściowych na ilość zakażeń.

Sposób odkażania	Ilość wyłożonych eksplantatów	Ilość eksplantatów bez zakażeń	Ilość eksplantatów z zakażeniami	Procent zakażeń
Odkażanie całych cebul	70	42	28	40,00
Odkażanie wypreparowanych łusek	20	16	4	20,00
Suma	90	58	32	35,56

Procent zakażeń w przypadku odkażania całych cebul wyniósł 40,00% natomiast w przypadku wcześniejszego wypreparowania łusek ilość zakażeń spadła do 20,00%. Modyfikację tą można więc uznać za skuteczną i polecić w przypadku odkażania łusek liściowych *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

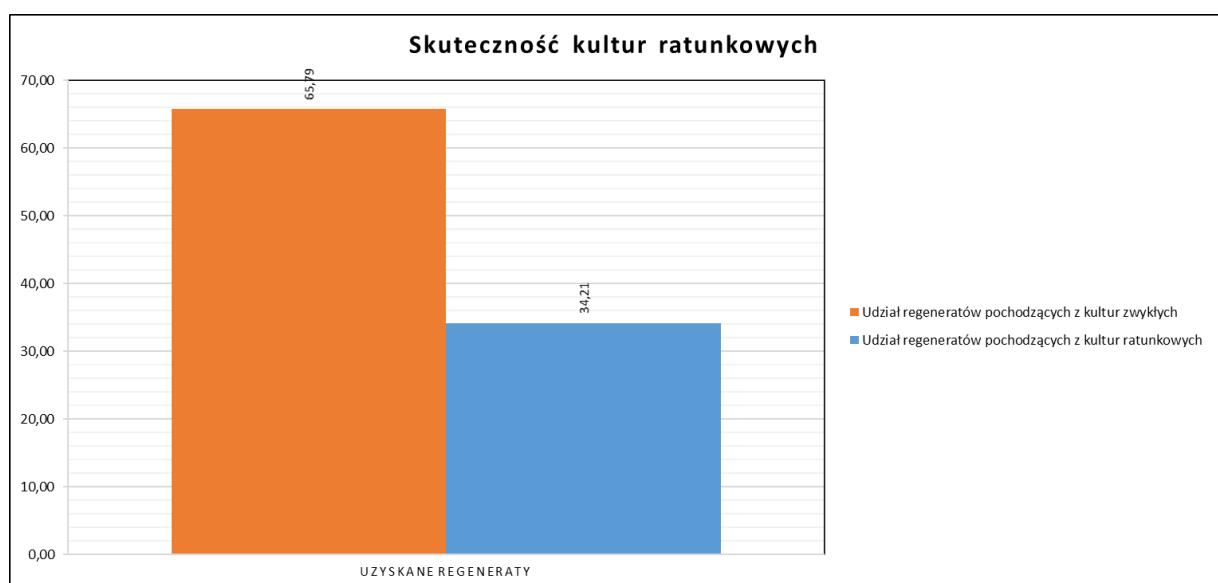


Rys. 4.20. Wpływ modyfikacji metody odkażania łusek liściowych na ilość zakażeń

4.1.6. Skuteczność kultur ratunkowych

Dodatkową modyfikacją było zakładanie tak zwanych kultur ratunkowych. Kultury takie zakładano jedynie dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet dla eksplantatów, które wykazywały rozwój w kulturach, które uległy częściowemu zakażeniu. Wykaz wszystkich założonych kultur zebrano w Tab. 3.5 oraz rozdziale 3.1.2.6. Sumarycznie założono 8 kultur z 23 eksplantatami. Ilość regeneratów uzyskanych z kultur ratunkowych, wraz z odniesieniem do ilości wszystkich regeneratów zebrano w Tab. 4.4.

Sumarycznie z 8 kultur ratunkowych otrzymano 39 regeneratów co stanowi ponad 1/3 wszystkich otrzymanych regeneratów, dokładnie 34,21%. Dane zwizualizowano na wykresie kolumnowym – Rys. 4.21. Można zatem stwierdzić, że wykonywanie kultur ratunkowych było zasadne i można tą praktykę polecić w przyszłych doświadczeniach.



Rys. 4.21. Skuteczność kultur ratunkowych

Tab. 4.4. Wykaz regeneratów otrzymanych z kultur ratunkowych.

Data założenia szalki źródłowej	Oznaczenie szalki źródłowej	Ilość otrzymanych regeneratów
Kultury zwykłe		
09.03.2018	ŚK/P/2	4
16.03.2018	ŚK/Ł/10	3
	ŚK/P/3	4
	ŚK/P/5	5
	ŚK/P/6	7
	ŚK/P/3	3
23.03.2018	ŚK/P/4	10
	ŚK/P/5	1
	ŚK/P/6	4
	ŚK/P/1	15
06.04.2018	ŚK/P/2	7
	ŚK/P/3	1
	ŚK/P/5	11
	Suma	75
Kultury ratunkowe		
06.04.2018	ŚK/P/7	11
16.04.2018	ŚK/P/1	15
	ŚK/P/3	4
20.04.2018	ŚK/P/1	9
Suma		39
Udział regeneratów pochodzących z kultur ratunkowych w całkowitej liczbie regeneratów		
Suma wszystkich regeneratów		114
Udział regeneratów pochodzących z kultur zwykłych		65,79%
Udział regeneratów pochodzących z kultur ratunkowych		34,21%

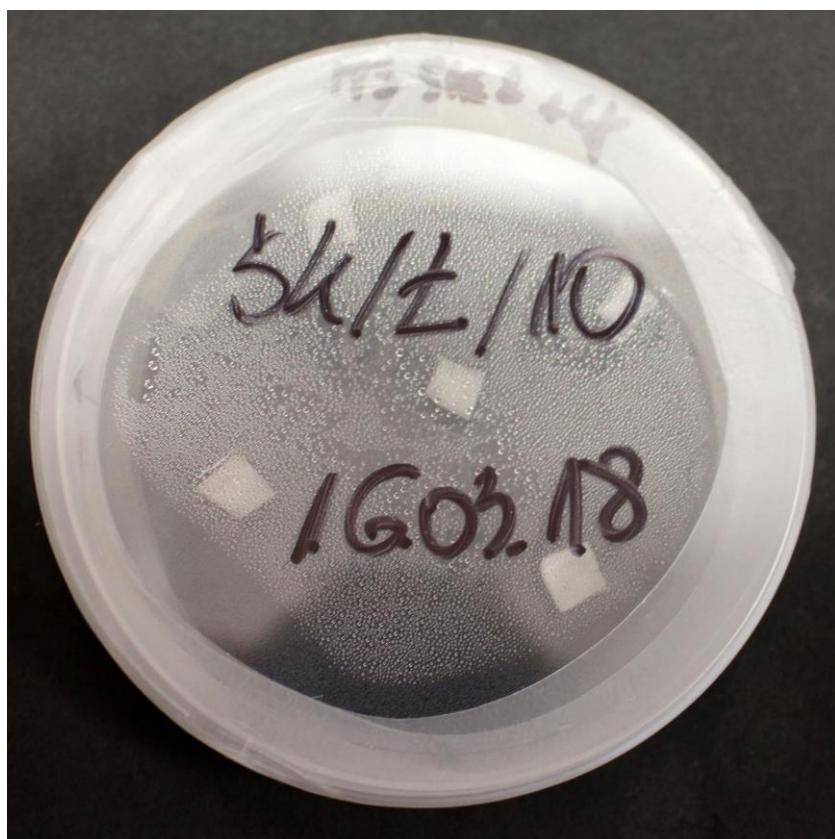
4.2. Regeneraty otrzymane po I etapie doświadczenia

Poniżej zestawiono dwa rozdziały zawierające dokumentacje fotograficzną dla rozwoju regeneratów u gatunku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet oraz *Fritillaria meleagris* L. W przypadku obu gatunków rozwój podjęły jedynie eksplantaty pochodzące od łuski oraz piętki.

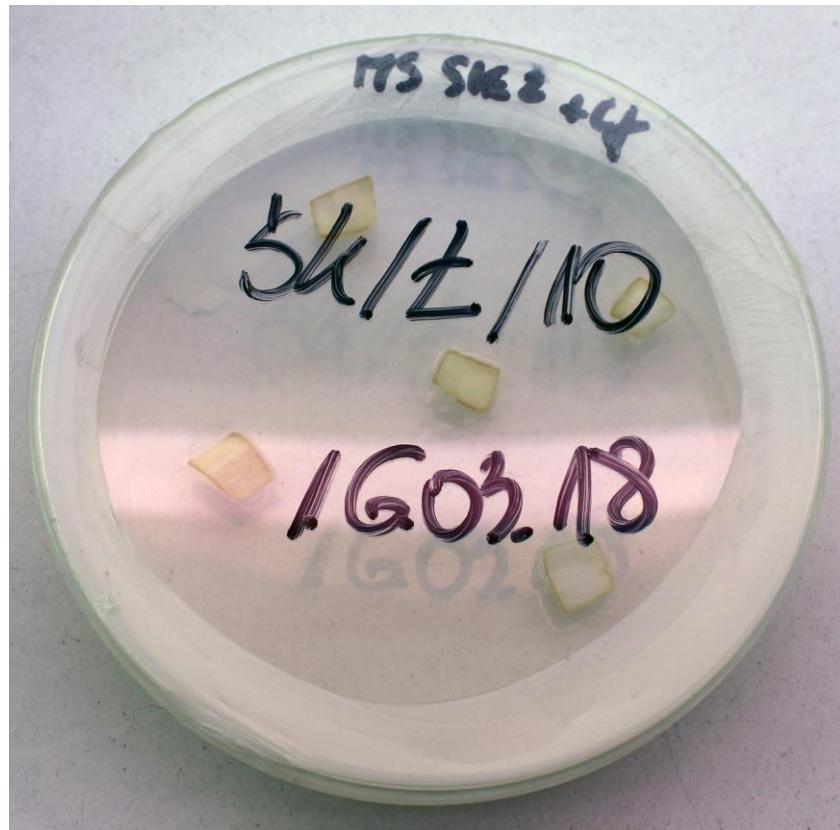
4.2.1. Organogeneza bezpośrednia pędowa w kulturach *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet, I etap

Dla śnieżycy karpackiej indukcję pąków przybyszowych przedstawiono dla łuski spichrzowej na podstawie jednej kultury, natomiast dla piętki na dwóch wybranych kulturach.

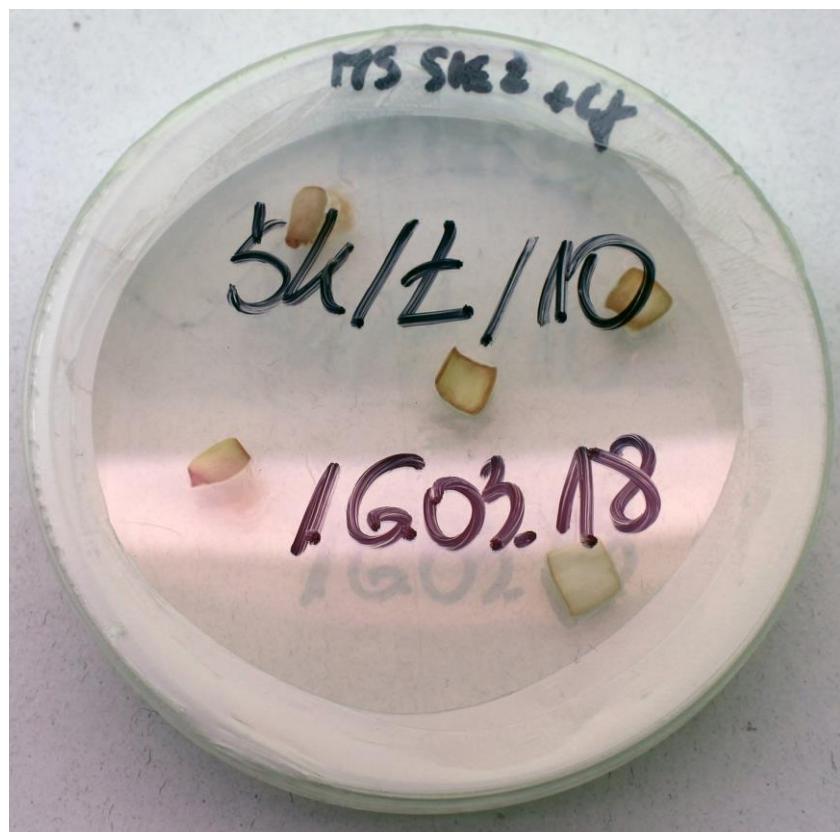
Dla łuski spichrzowej indukcje pąków przybyszowych przedstawiono na przykładzie kultury ŠK/Ł/10 założonej dnia 16 marca 2018 na pożywce z dodatkiem antybiotyku – zdjęcia przedstawione na Rys. 4.22 do Rys. 4.28. Obserwacje przeprowadzono kilkukrotnie 23 marca, 06 kwietnia, 16 kwietnia, 20 kwietnia, 27 kwietnia oraz 11 maja 2018 roku. Pąki przybyszowe były widoczne w kulturze dopiero podczas obserwacji wykonanej dnia 11 maja 2018 roku a więc po 57 dniach, to jest około 8 tygodniach od założenia kultury. Regeneraty miały postać drobnych okrągłych, białych mikrocebulek.



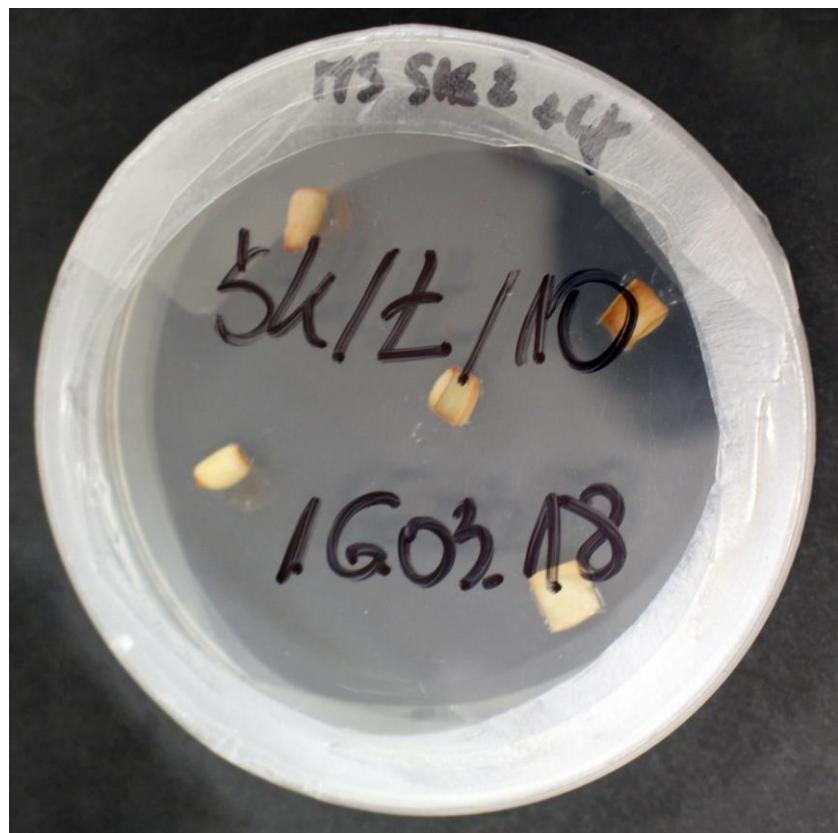
Rys. 4.22. Śnieżycy karpacka kultura łuskowa ŠK/Ł/10 – w dniu założenia



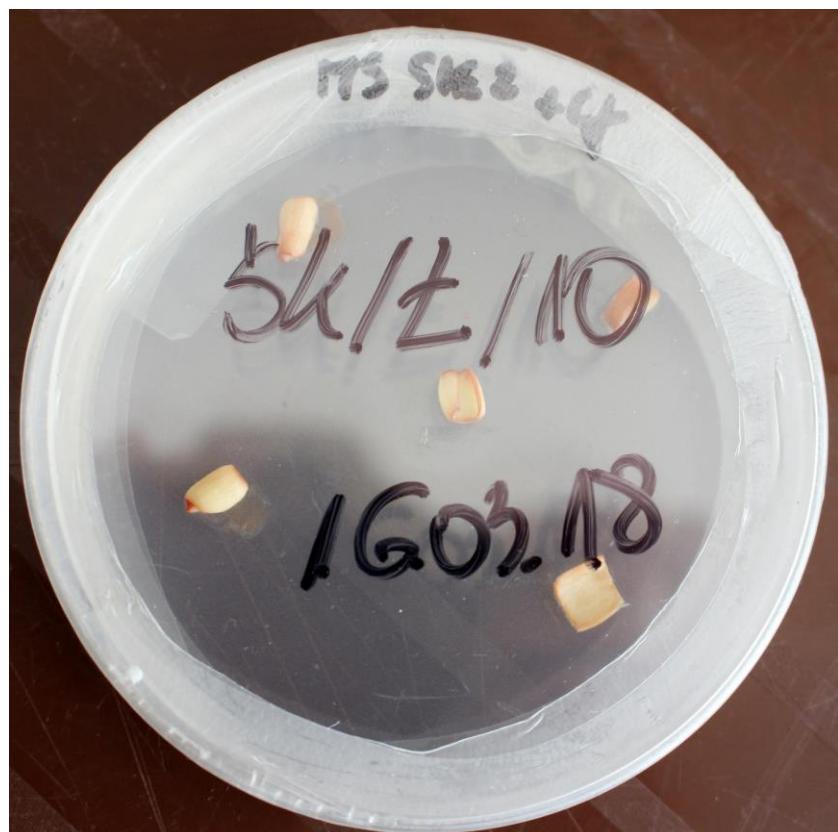
Rys. 4.23. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 23.03.2018



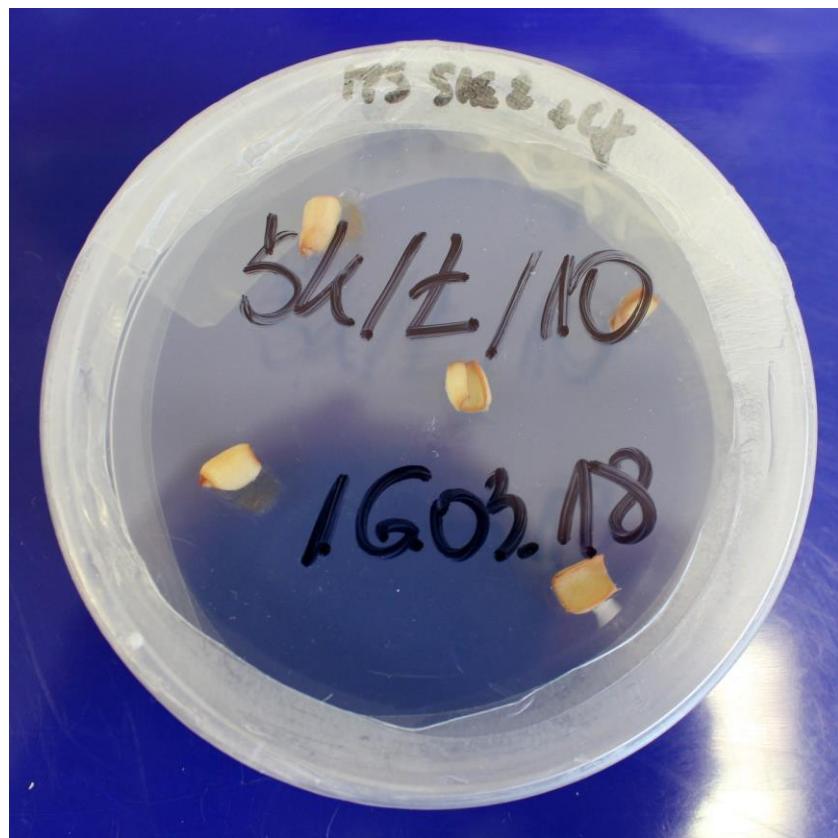
Rys. 4.24. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 06.04.2018



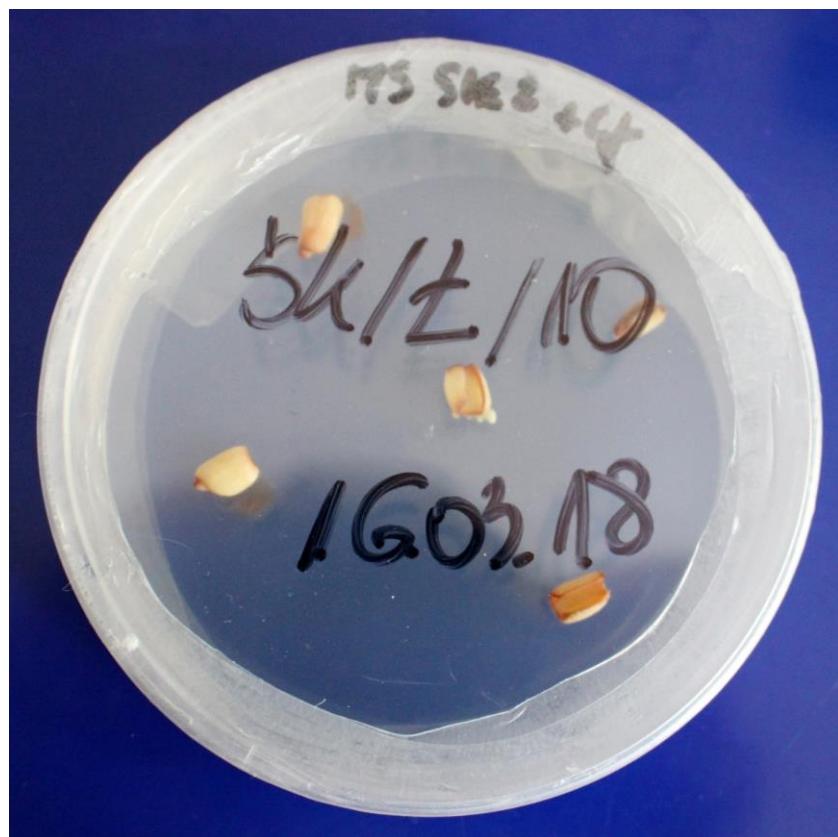
Rys. 4.25. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 16.04.2018



Rys. 4.26. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 20.04.2018



Rys. 4.27. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 27.04.2018



Rys. 4.28. Śnieżyca karpacka kultura łuskowa ŠK/L/10 – obserwacja 11.05.2018

Dla piętki indukcje pąków przybyszowych przedstawiono na przykładzie kultur ŚK/P/8 oraz ŚK/P/1 założonych dnia 16 marca 2018 na pożywce z dodatkiem antybiotyku. Zdjęcia dla ŚK/P/8 przedstawiono na Rys. 4.30 do Rys. 4.37, natomiast dla ŚK/P/1 na Rys. 4.38 do Rys. 4.45. Obserwacje przeprowadzono 23 marca, 06 kwietnia, 16 kwietnia, 20 kwietnia, 27 kwietnia oraz 11 maja 2018 roku.

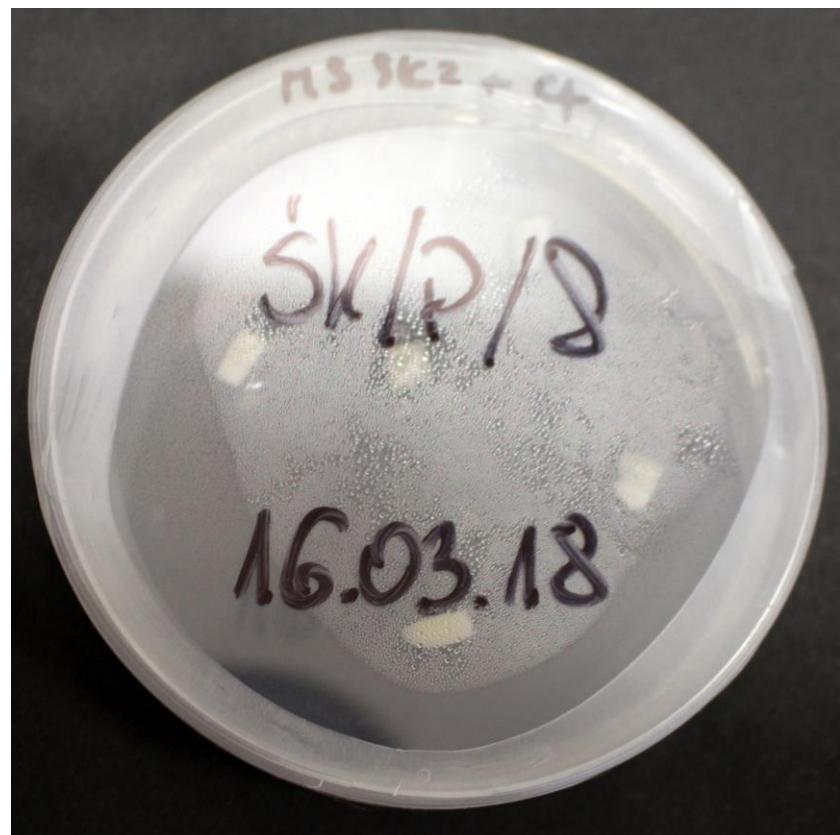
Pierwsze pąki przybyszowe w przypadku ŚK/P/8 były widoczne podczas obserwacji dnia 16 kwietnia a więc po 32 dniach to jest około 4,5 tygodniach od założenia kultury. Pąki przybyszowe miały postać podłużnych stosunkowy wąskich białych mikrocebulek z zielonym wierzchołkiem.

W przypadku kultury ŚK/P/1 pierwsze pąki przybyszowe dało się zaobserwować już podczas obserwacji wykonanej 06 kwietnia a więc po 22 dniach to jest około 3 tygodniach od założenia kultury. Pąki przybyszowe miały postać stosunkowo grubych mikrocebulek koloru białego z lekkim zażółceniem, czasem zazielienieniem w górnej części.

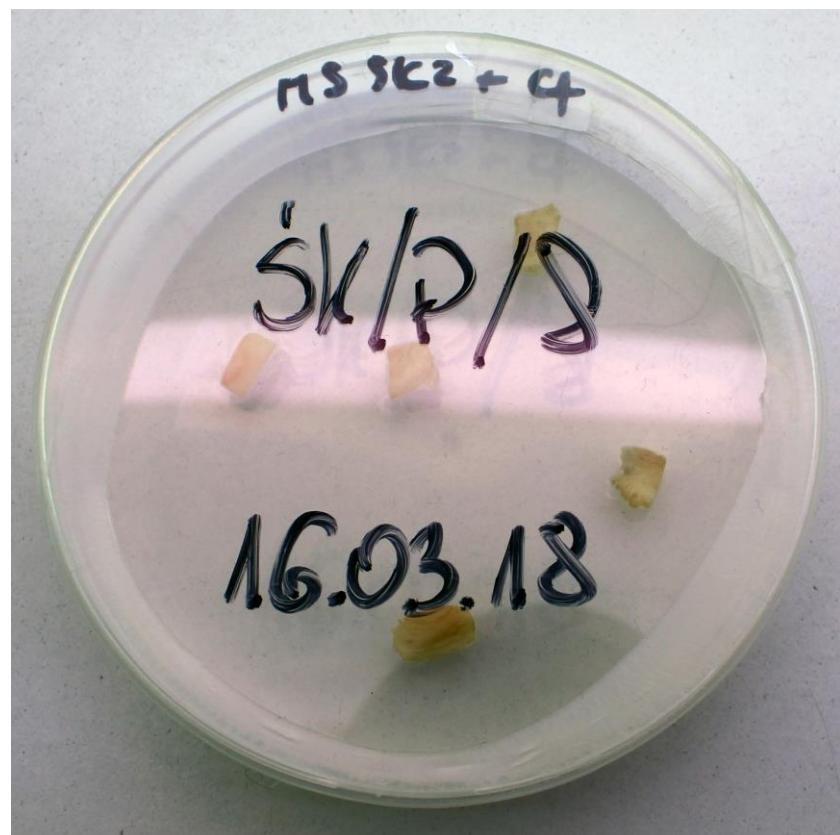
Można więc powiedzieć, że w przypadku kultur pochodzących z piętki powstawały regeneraty dwóch rodzajów, wydłużone z wyraźnym zazielonym wierzchołkiem, prawa strona Rys. 4.29 oraz spłaszczone, krępe z delikatnym zażółceniem lub zazielienieniem, lewa strona Rys. 4.29.



Rys. 4.29. Dwa rodzaje regeneratów otrzymane w kulturach z piętki u śnieżycy karpackiej



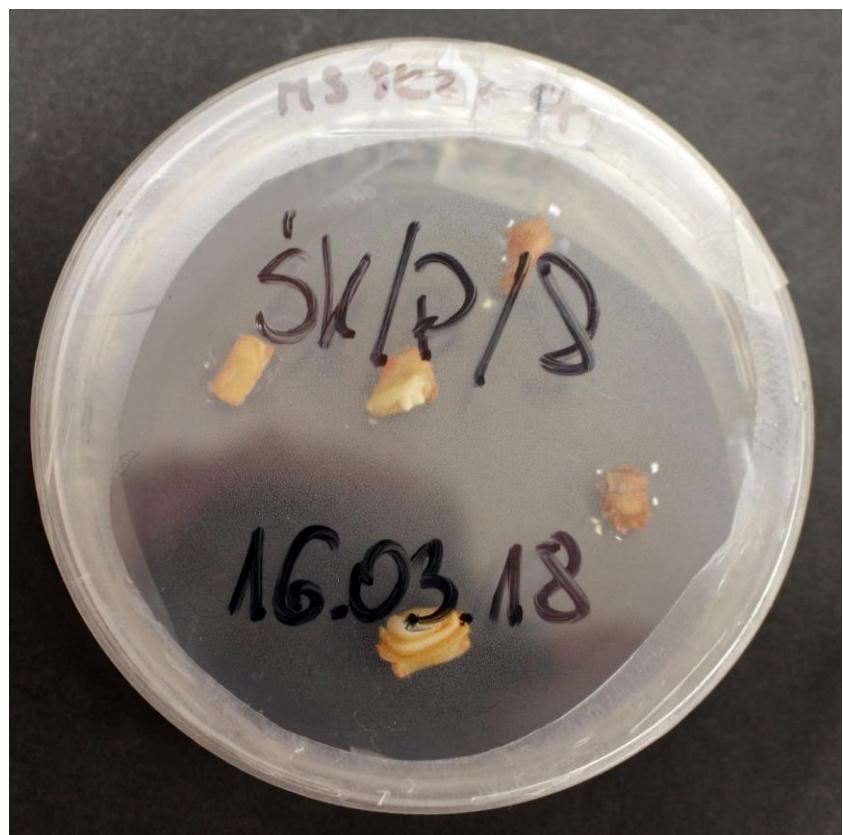
Rys. 4.30. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŚK/P/8 – w dniu założenia



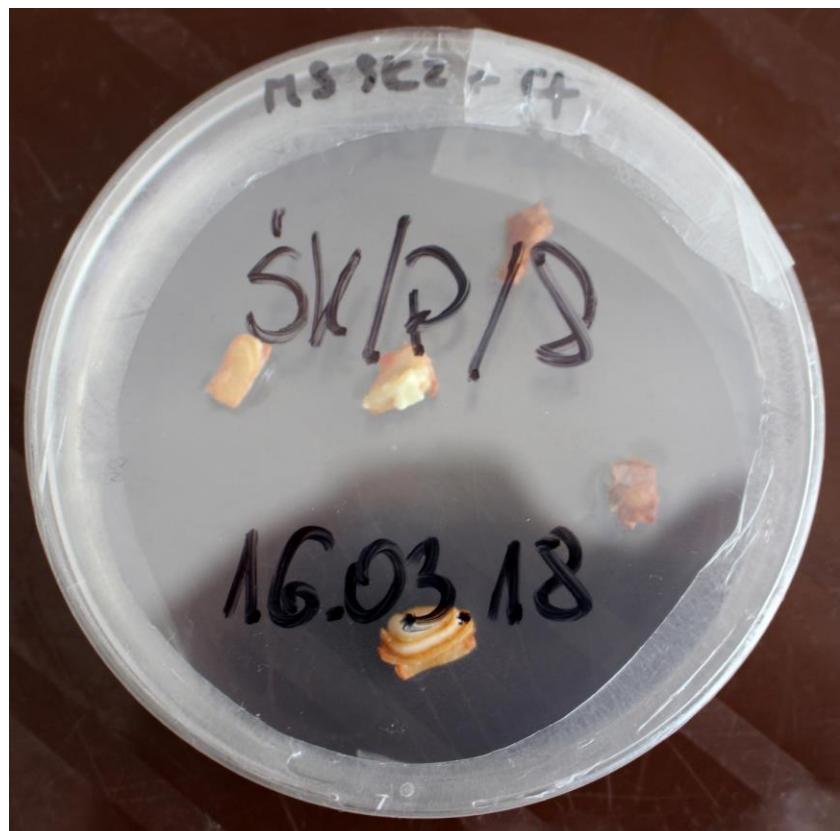
Rys. 4.31. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŚK/P/8 – obserwacja 23.03.2018



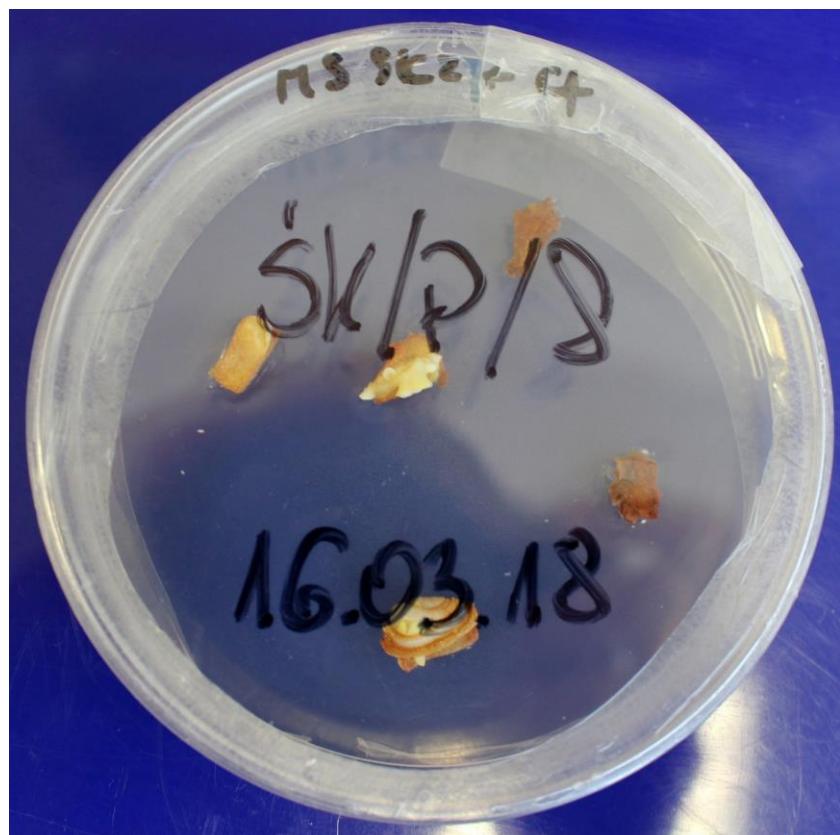
Rys. 4.32. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 06.04.2018



Rys. 4.33. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 16.04.2018



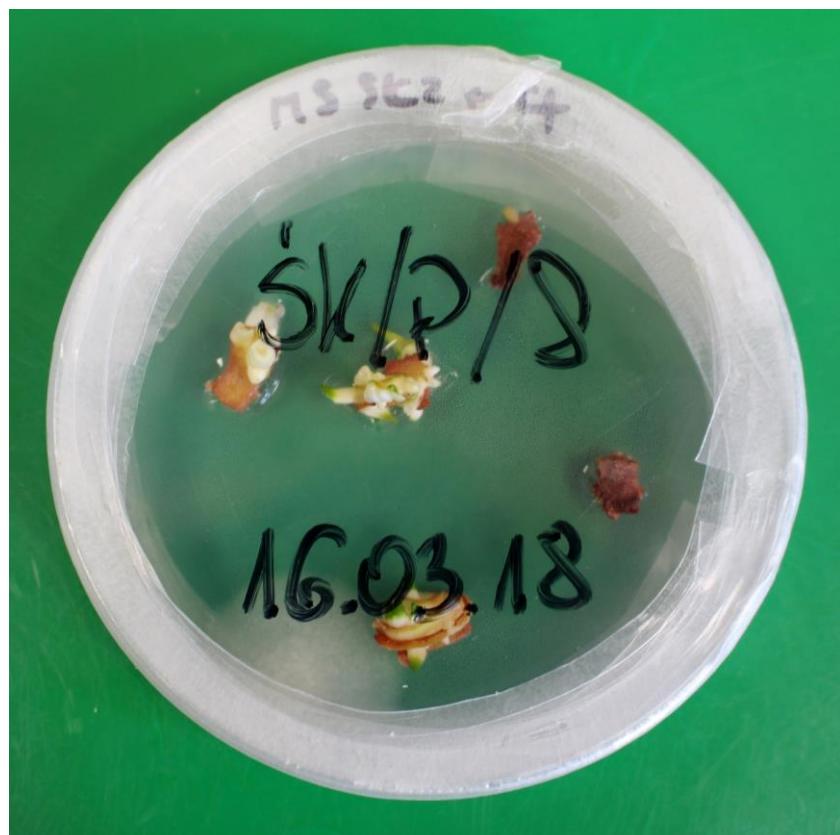
Rys. 4.34. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 20.04.2018



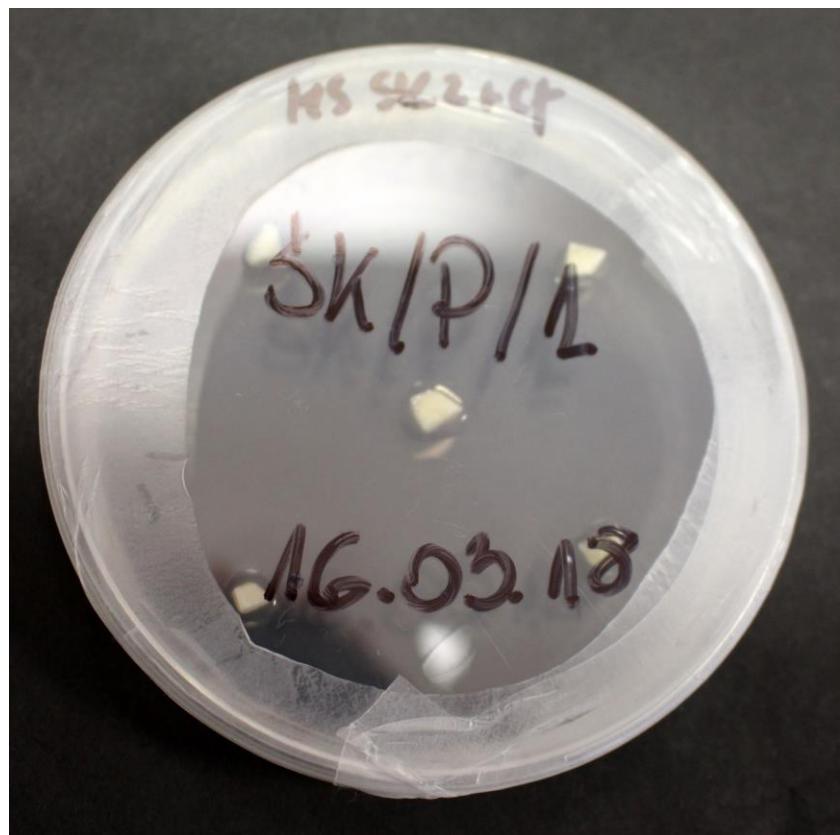
Rys. 4.35. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 27.04.2018



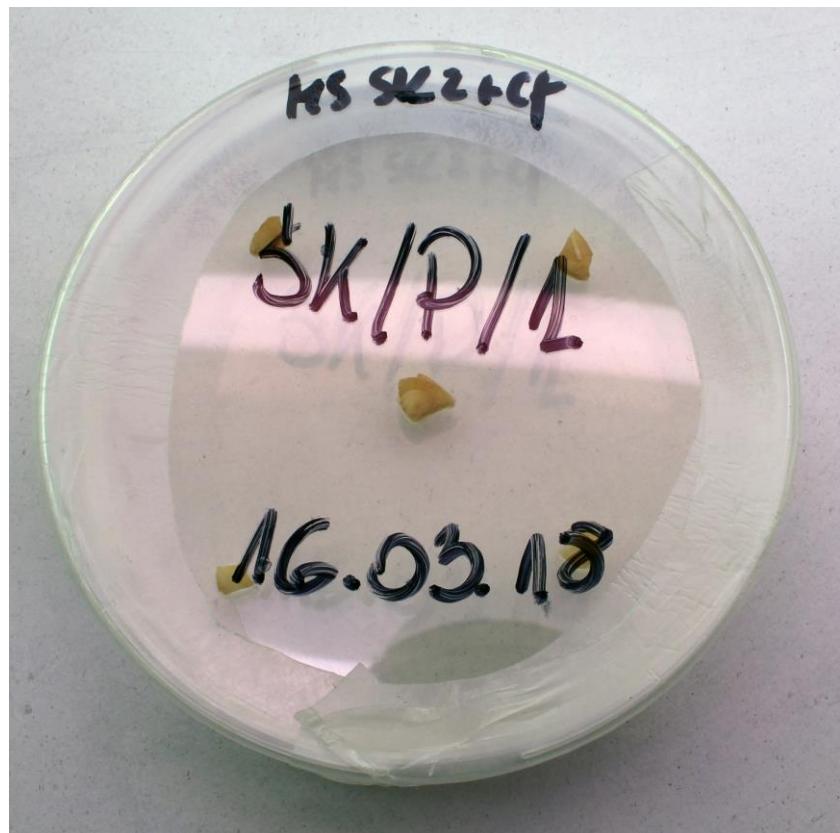
Rys. 4.36. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 11.05.2018



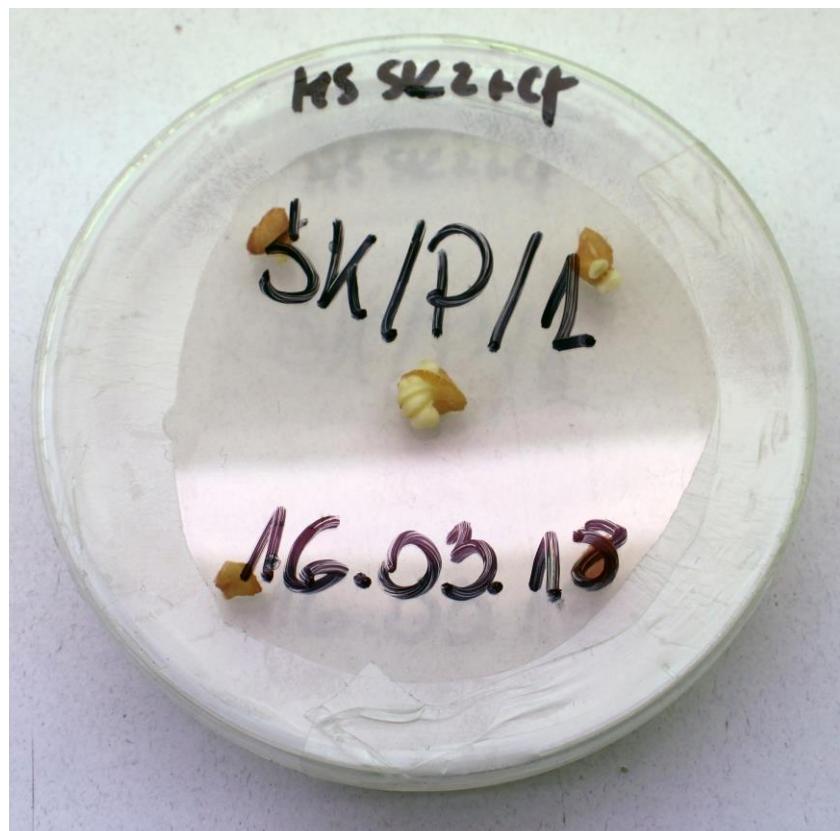
Rys. 4.37. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/8 – obserwacja 25.05.2018



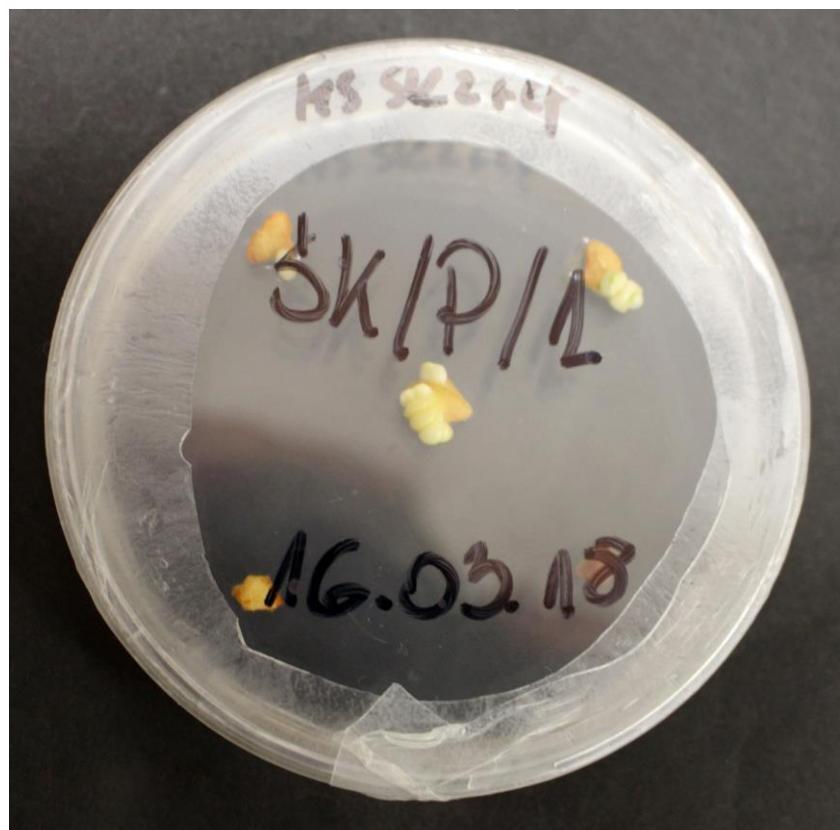
Rys. 4.38. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – w dniu założenia



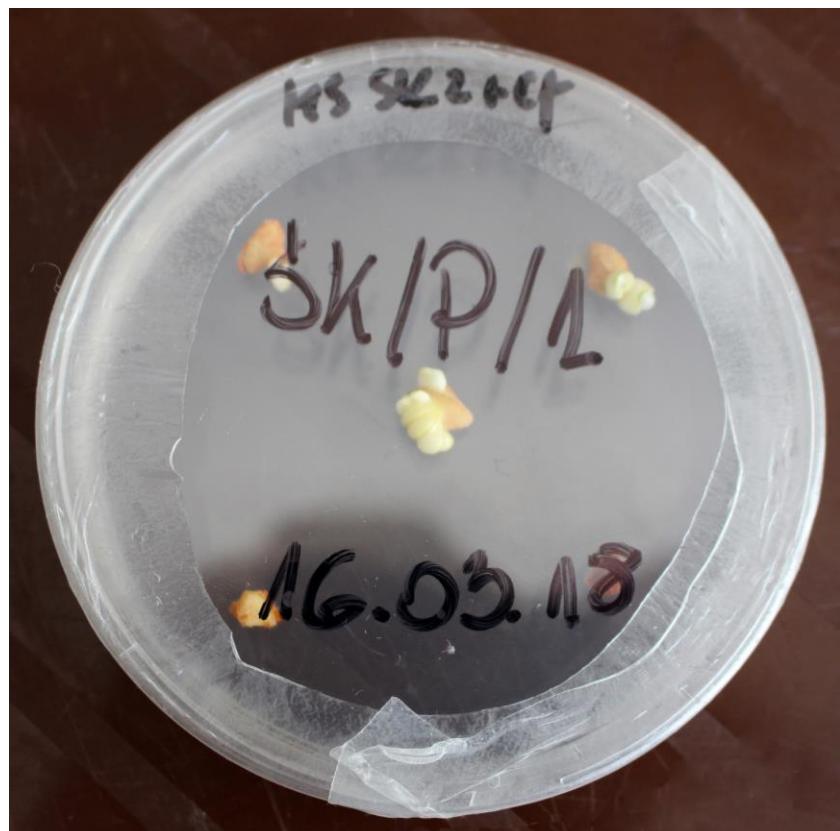
Rys. 4.39. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 23.03.2018



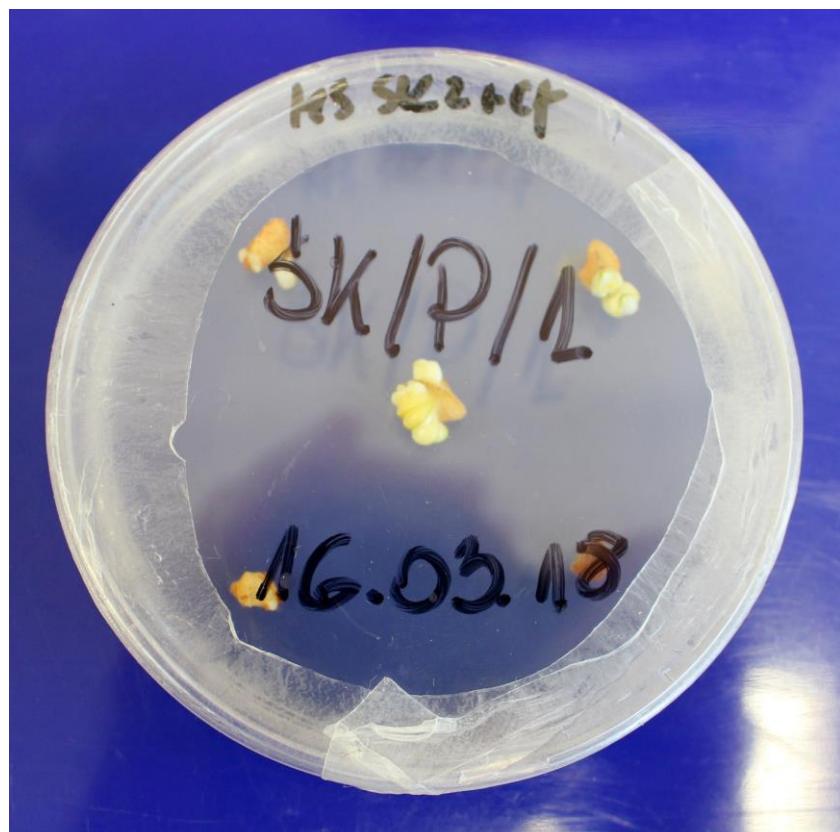
Rys. 4.40. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 06.04.2018



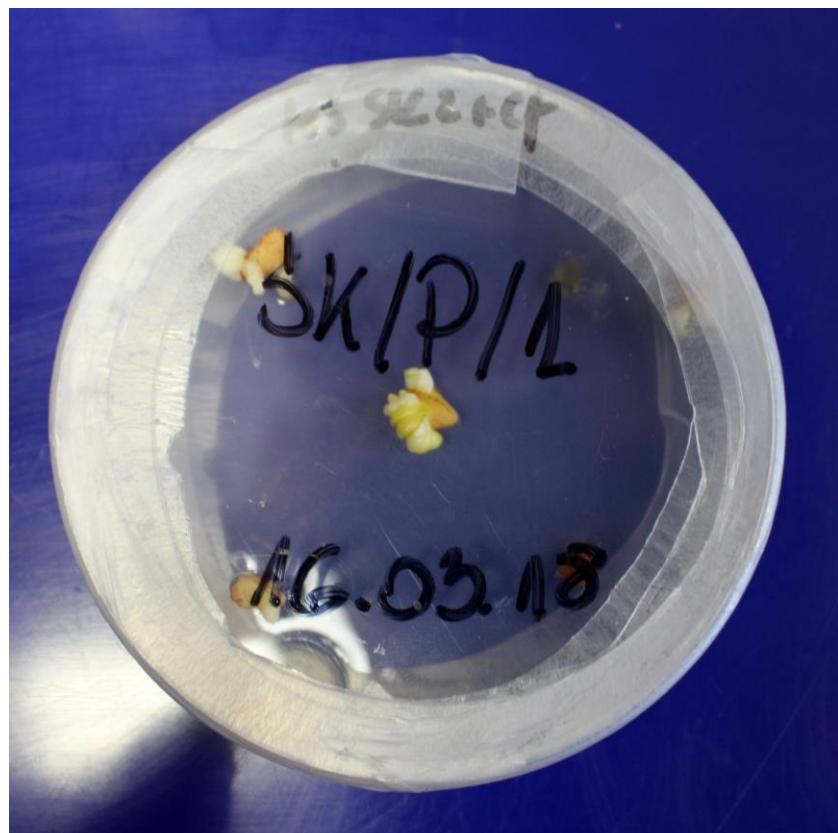
Rys. 4.41. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 16.04.2018



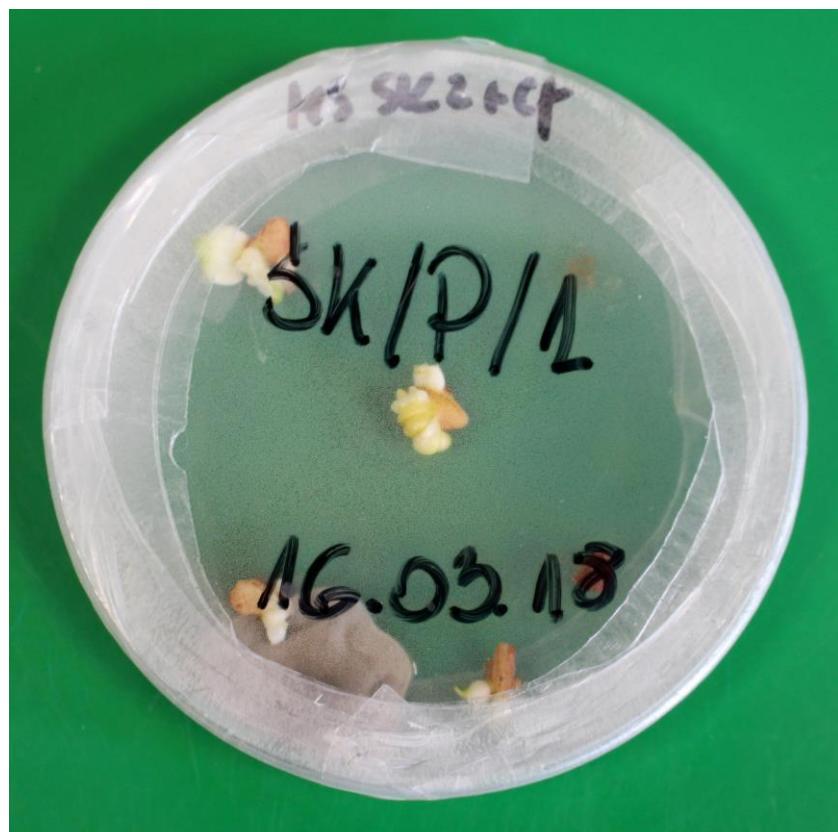
Rys. 4.42. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 20.04.2018



Rys. 4.43. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 27.04.2018



Rys. 4.44. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 11.05.2018



Rys. 4.45. Śnieżyca karpacka kultura piętkowa ŠK/P/1 – obserwacja 25.05.2018

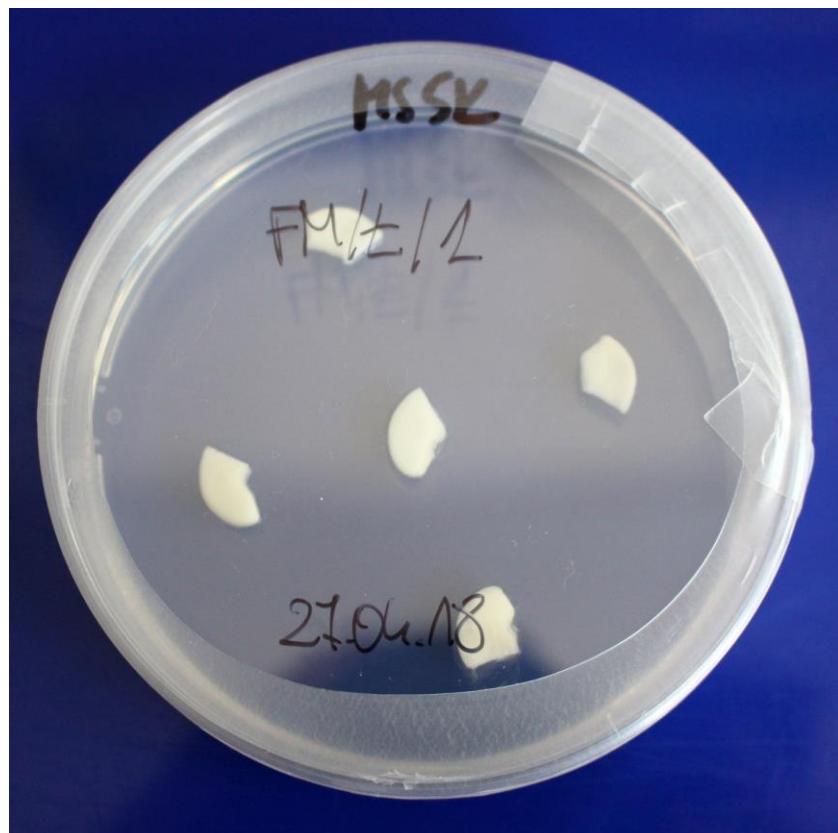
4.2.2. Organogeneza bezpośrednia pędowa w kulturach *Fritillaria meleagris* L.

Dla szachownicy kostkowatej indukcję pąków przybyszowych przedstawiono dla kultur zawierających eksplantaty pochodzące od łuski spichrzowej na podstawie dwóch kultur, natomiast dla piętki na przykładzie jednej kultury.

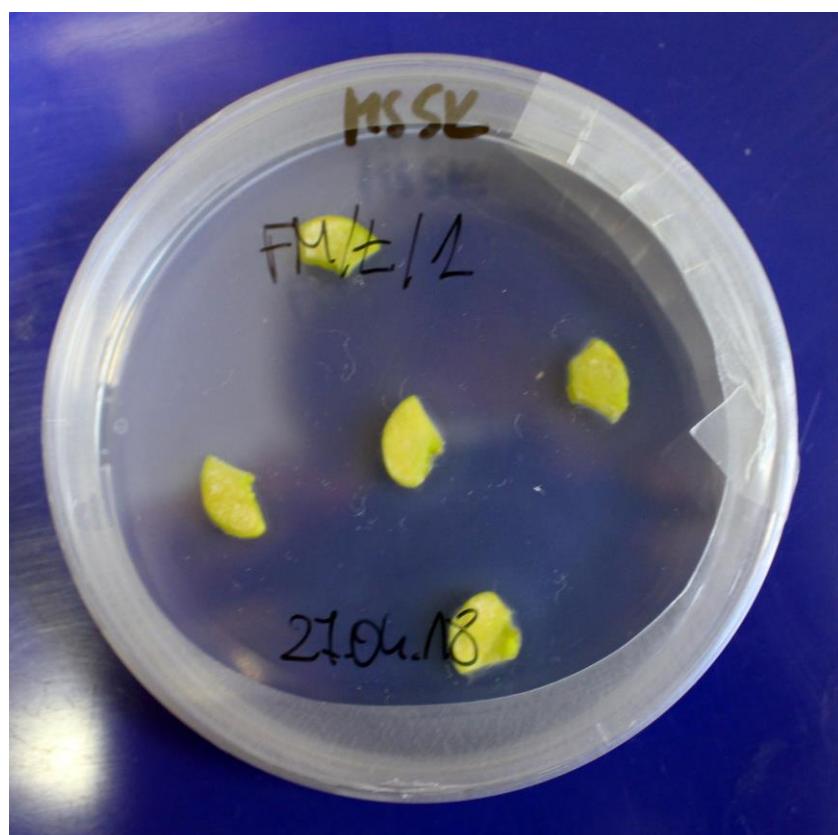
Dla łuski spichrzowej indukcje pąków przybyszowych przedstawiono na przykładzie kultur FM/Ł/1 założonej dnia 27 kwietnia – zdjęcia przedstawione na Rys. 4.46 do Rys. 4.49 oraz FM/Ł/15 założonej dnia 11 maja – zdjęcia przedstawione na Rys. 4.50 do Rys. 4.52.

W przypadku FM/Ł/1 obserwacje prowadzono dnia 11 maja, 25 maja oraz 22 czerwca. Pierwsze regeneraty były widoczne podczas obserwacji wykonanej 25 maja a więc po 29 dniach od założeniach kultury (około 4 tygodniach). Regeneraty miały postać okrągłych mikrocebulek koloru zielono-żółtego z górną częścią w kolorze białym. Podczas obserwacji wykonanej 22 czerwca z a więc po 57 dniach (około 8 tygodniach) na powierzchni regeneratów obecnych podczas poprzedniej obserwacji pojawiły się nowe. Wygląda więc na to, że pożywka była odpowiednia również do etapu II to jest etapu namnażania. Pomiędzy obserwacją wykonaną 25 maja a tą wykonaną 22 czerwca wskazane byłoby wykonanie pasażowania.

W przypadku FM/Ł/15 obserwacje prowadzono dwukrotnie 25 maja oraz 22 czerwca. Regeneraty były widoczne dopiero podczas obserwacji wykonanej 22 czerwca a więc po 43 dniach (około 6 tygodniach) od założenia kultury. Należy jednak zaznaczyć, że obserwowane 22 czerwca regeneraty pojawiły się na innych regeneratach uzyskanych wcześniej. Ze względu na odległość czasową pomiędzy obserwacjami nie jesteśmy w stanie określić kiedy pojawiły się pierwsze regeneraty będące bazą do tych obserwowanych 22 czerwca. Uzyskane regeneraty miały postać drobnych okrągłych mikrocebulek koloru białego. Świadczy to o tym, że regeneraty początkowo miały kolor biały, jednak z upływem czasu przybierały kolor żółtozielony.



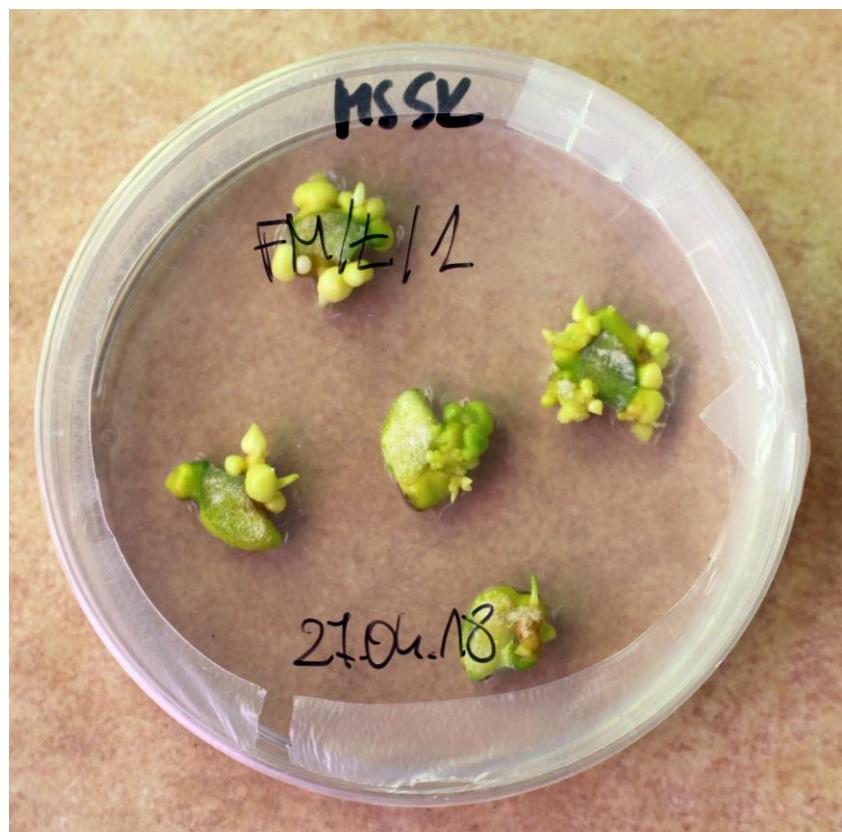
Rys. 4.46. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/1 – w dniu założenia



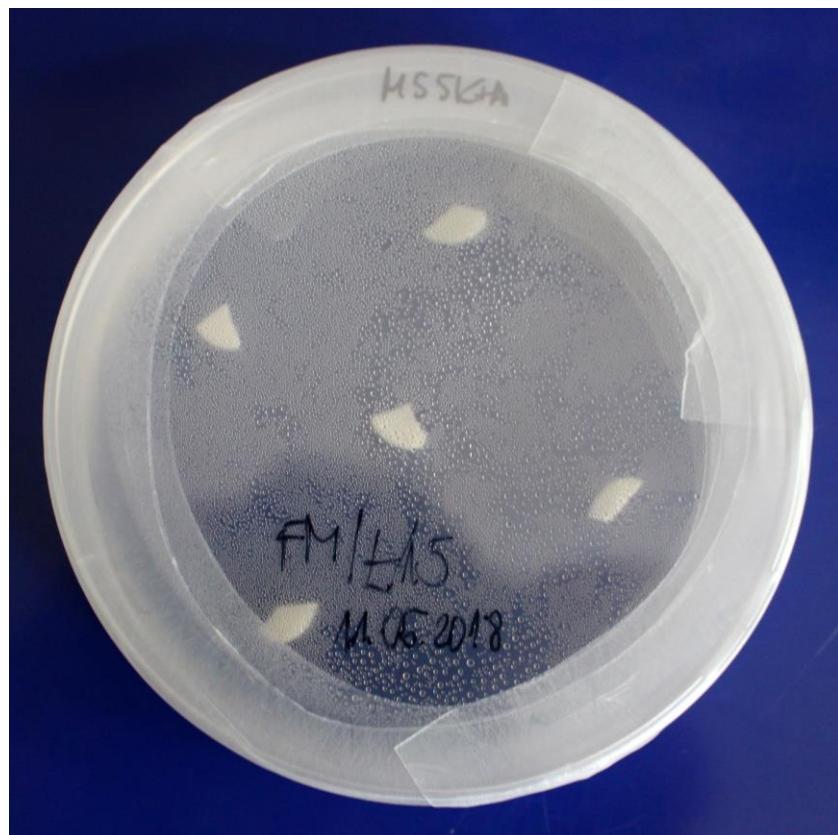
Rys. 4.47. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/1 – obserwacja 11.05.2018



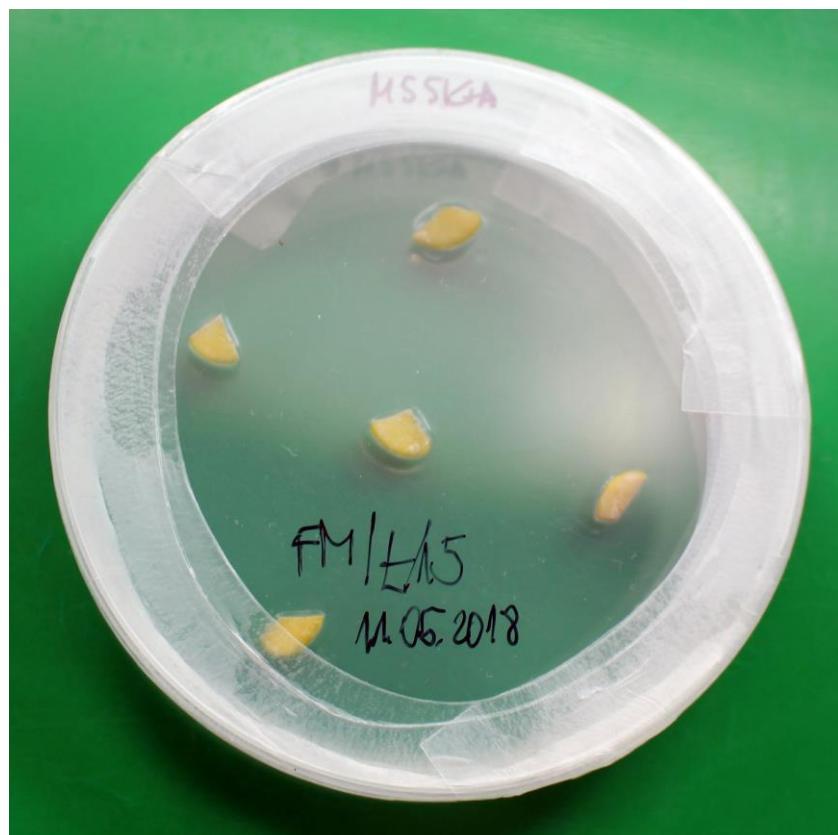
Rys. 4.48. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/1 – obserwacja 25.05.2018



Rys. 4.49. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/1 – obserwacja 22.06.2018



Rys. 4.50. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/15 – w dniu założenia

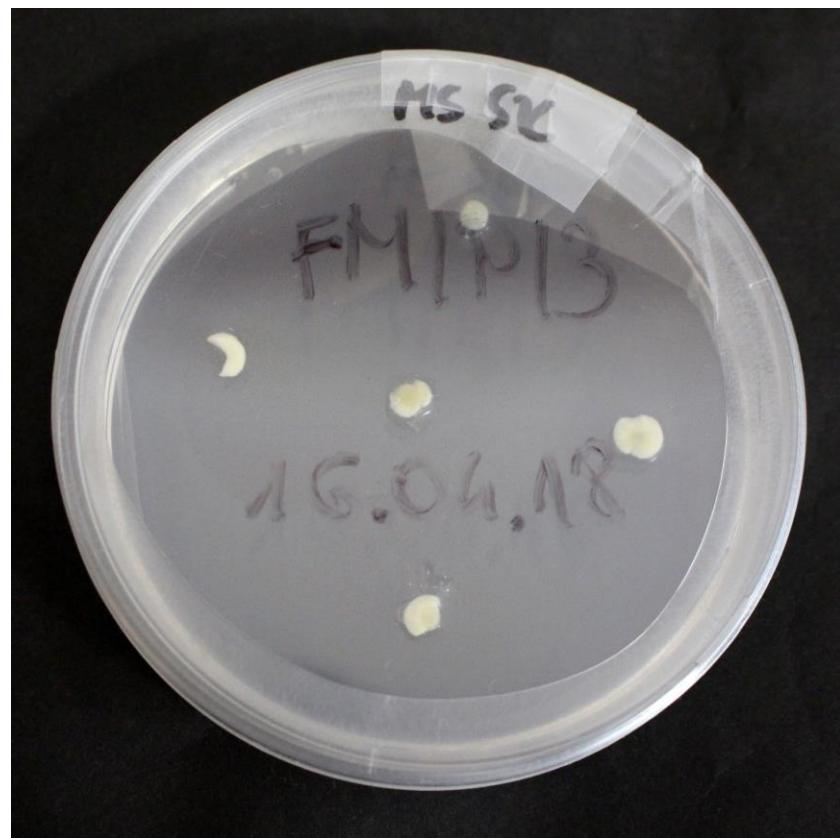


Rys. 4.51. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/15 – obserwacja 25.05.2018

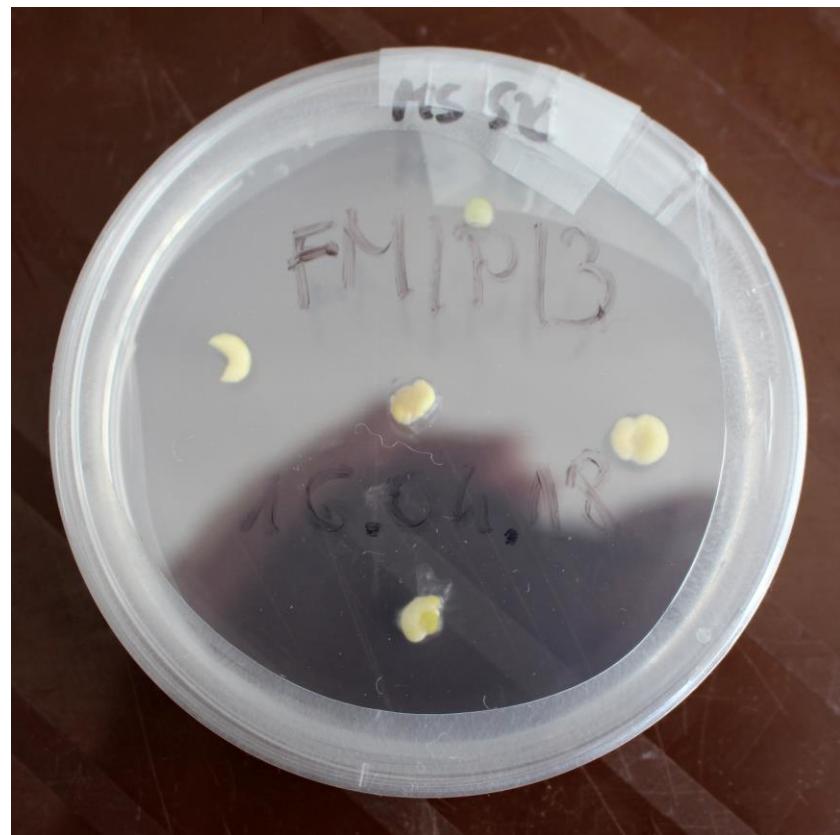


Rys. 4.52. Szachownica kostkowata kultura łuskowa FM/L/15 – obserwacja 22.06.2018

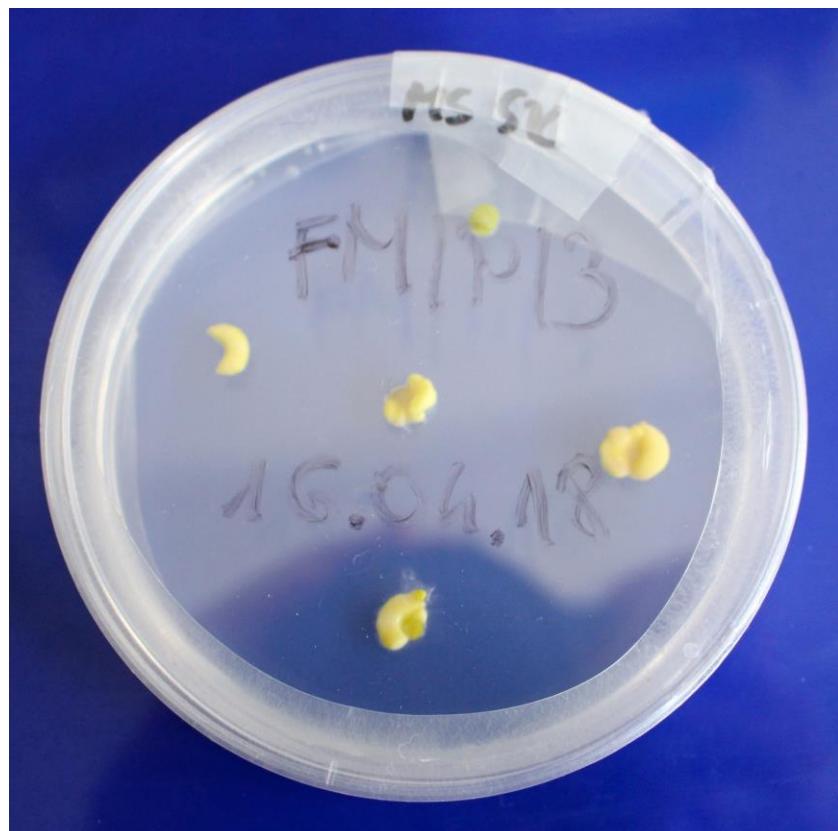
Dla kultur pochodzących z piętki indukcje pąków przybyszowych przedstawiono na przykładzie kultury FM/P/3 założonej dnia 16 kwietnia. Kulturę podczas obserwacji wykonanych dnia 20 kwietnia, 27 kwietnia, 15 maja, 25 maja oraz 22 czerwca przedstawiono na Rys. 4.53 do Rys. 4.58. Pierwsze regeneraty były widoczne podczas obserwacji wykonanej dnia 11 maja a więc po 26 dniach (około 4 tygodniach) od założenia kultury. W późniejszym okresie, podobnie jak w przypadku kultur łuskowych na obecnych regeneratach pojawiały się nowe. Regeneraty miały podobną postać jak te uzyskane w kulturach łuskowych.



Rys. 4.53. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – w dniu założenia



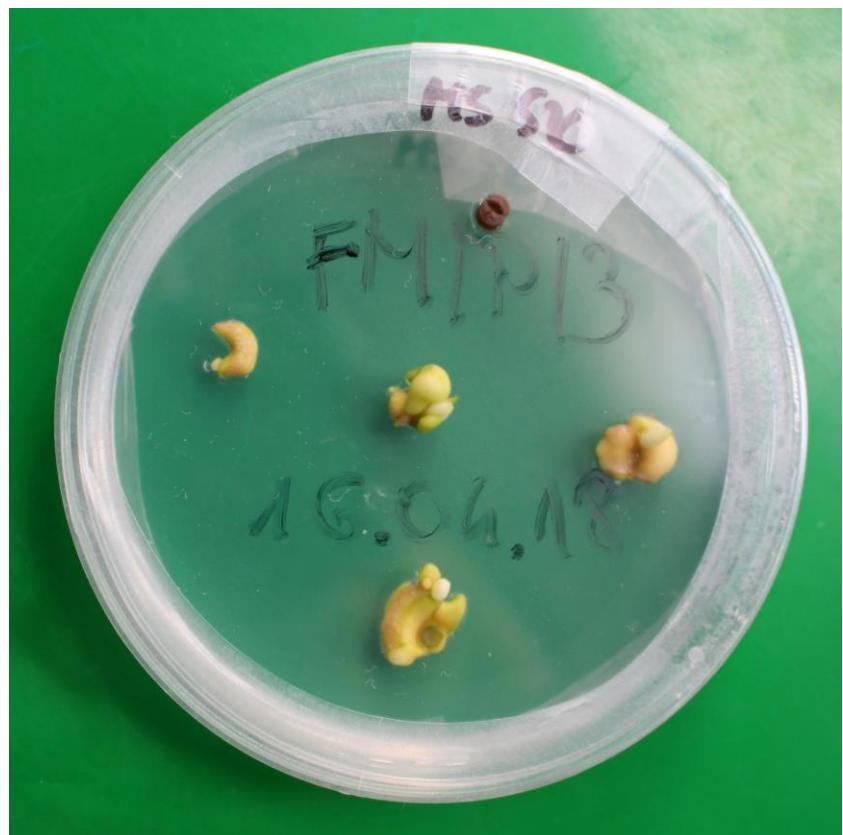
Rys. 4.54. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – obserwacja 20.04.2018



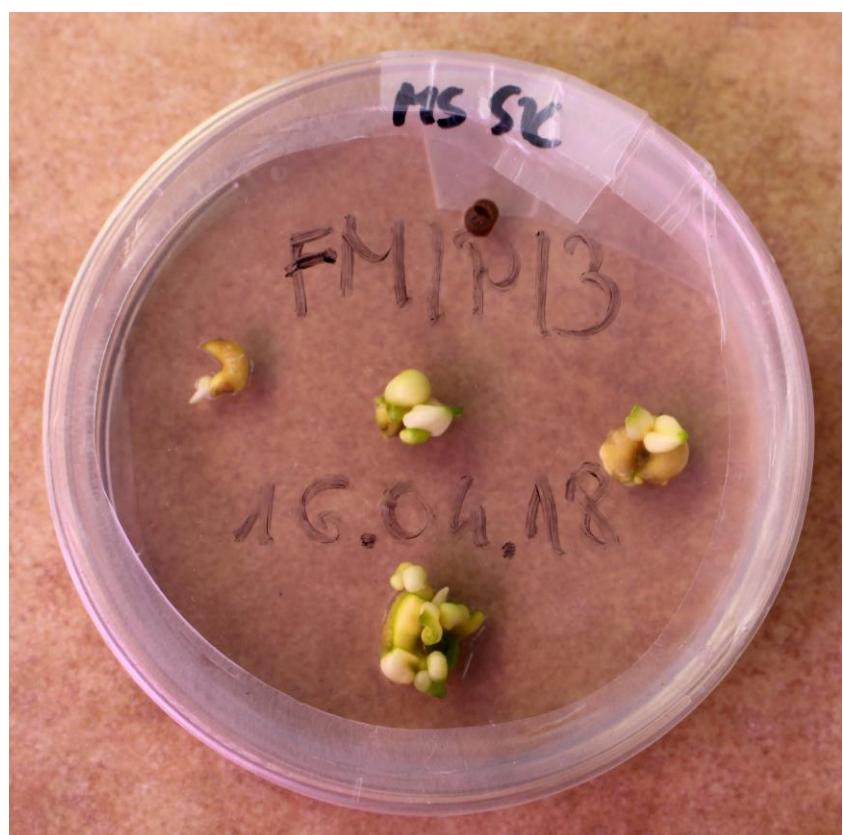
Rys. 4.55. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – obserwacja 27.04.2018



Rys. 4.56. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – obserwacja 11.05.2018



Rys. 4.57. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – obserwacja 25.05.2018



Rys. 4.58. Szachownica kostkowata kultura piętkowa FM/P/3 – obserwacja 22.06.2018

4.2.3. Organogeneza korzeniowa u obu gatunków

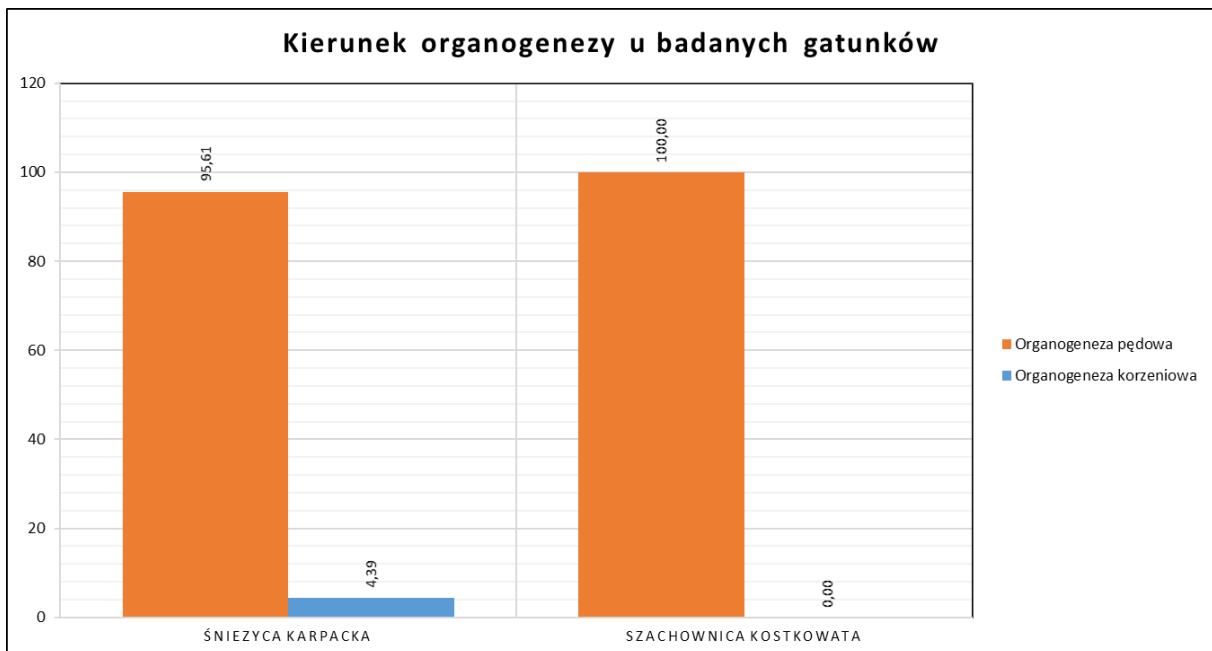
W większości przypadków organogeneza przybyszowa miała charakter organogenezy pędowej – kaulogenezy, tak jak np. w kulturach przedstawionych na Rys. 4.22 do Rys. 4.45, natomiast sporadycznie pojawiała się również organogeneza korzeniowa – ryzogeneza. Organogeneza tego typu pojawiała się jedynie w kulturach piętkowych, i jedynie u śnieżycy karpackiej. Ryzogeneza była znacznie rzadsza od kaulogenezy, wystąpiła w przypadku 4,39 % regeneratów. Zbiorcze dane zebrano w

Tab. 4.5 i zwizualizowano na wykresie kolumnowym przedstawionym na Rys. 4.59.

Tab. 4.5 Kierunek organogenezy u obu badanych gatunków.

Gatunek	Rodzaj organogenezy	Ilość regeneratów		Suma
		sztuk	%	
Śnieżycy karpacka	pędowa	109	95,61	114
	korzeniowa	5	4,39	
Szachownica kostkowata	pędowa	231	100,00	231
	korzeniowa	0	0,00	

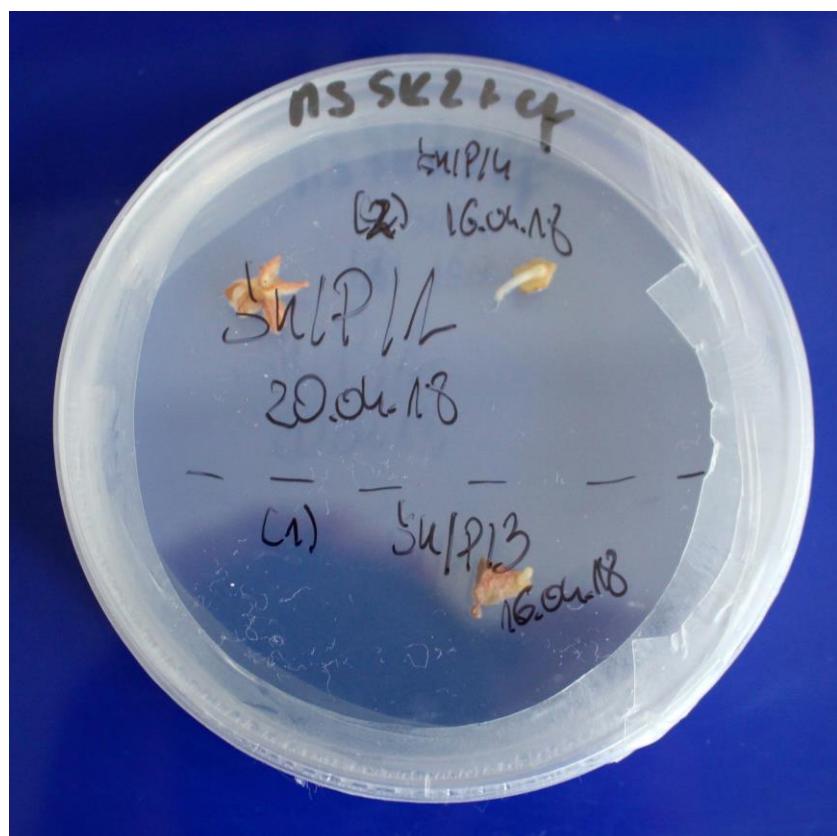
Przykład takiej organogenezy możemy zaobserwować w kulturze ŠK/P/1 założonej 20 kwietnia 2018 roku przedstawionej na Rys. 4.60 oraz Rys. 4.61. Na eksplantacie o indeksie '2' korzeń ma postać grubego walca o kolorze białym. Regenerat wykazuje geotropizm dodatni.



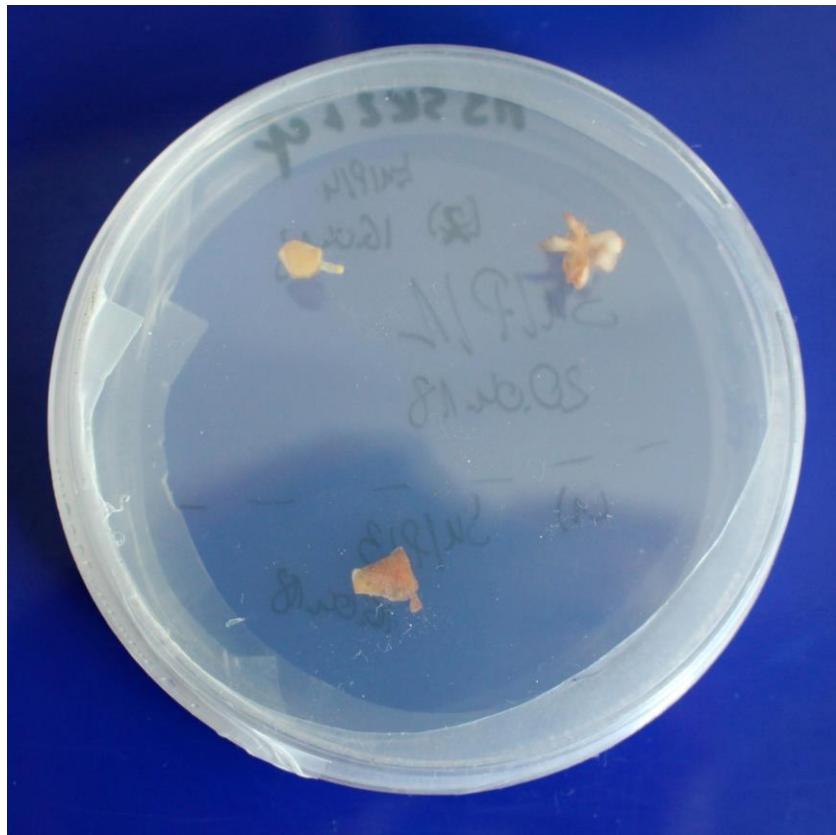
Rys. 4.59. Kierunek organogenezy u śnieżycy karpackiej oraz szachownicy kostkowej

Ciekawym aspektem jest przyczyna pojawiania się organogenezy korzeniowej w kulturach śnieżycy karpackiej. Z jednej strony pojawianie się ryzogenezy może świadczyć o tym, że część wyłożonych eksplantatów zawierała już tkankę, która jeszcze w roślinie rozpoczęła różnicowanie w kierunku korzenia przybyszowego i tkanka to kontynuowała rozwój w tym kierunku w kulturze. Z drugiej strony przyczyną może być również skład pożywki (szczególnie rodzaj oraz stężenie regulatorów wzrostu), który powoduje z pewnym prawdopodobieństwem pojawianie się organogenezy korzeniowej zamiast pędowej.

Stwierdzenie rzeczywistej przyczyny wymaga dalszych doświadczeń. W przypadku jeśli kluczowy okazałby się skład pożywki, otwieramy drogę do dalszych doświadczeń w kierunku opracowania pożywek, które warunkowałyby 100% organogenezy danego typu.



Rys. 4.60. Śnieżycę karpacką kultura piętkowa z ryzogenezy (ekspplantat o indeksie 2) – awers



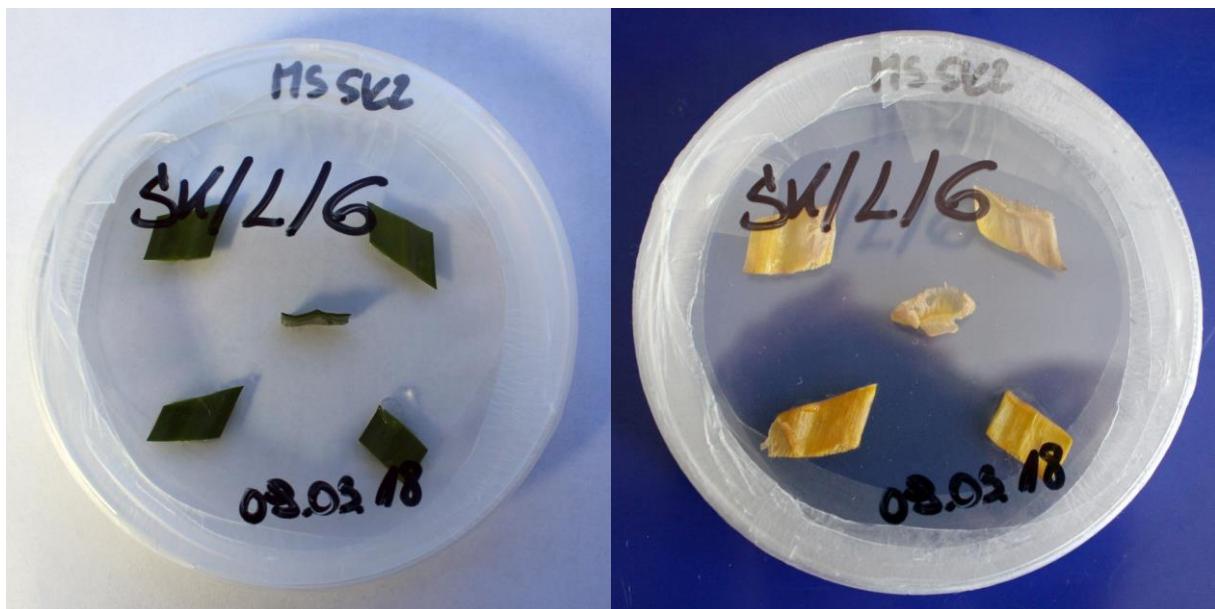
Rys. 4.61. Śnieżycę karpacką kultura piętкова z ryzogenezy (eksplantat o indeksie 2) –
rewers

4.2.4. Kultury które nie podjęły regeneracji.

W przypadku części kultur podczas I etapu mikrorozmnażania pojawiły się eksplantaty, które nie uległy zakażaniu ani nie podjęły regeneracji przez cały okres prowadzenia I etapu. W przypadku śnieżycy wiosennej były to np. kultury zawierające eksplantaty pochodzenia liściowego. Przykład takiej kultury założonej 09 marca przedstawiono na Rys. 4.62, z lewej strony zdjęcie z dnia założenia z prawej podczas obserwacji wykonanej 11 maja. Eksplantaty zmieniły kolor na słomiany, dodatkowo tkanka uległa częściowemu rozpadowi – rozpad jest szczególnie widoczny w przypadku eksplantatu o indeksie '5'.

W przypadku szachownicy kostkowej przykładami kultur, które nie podjęły wzrostu były kultury z eksplantatami pochodząymi z fragmentów łodygi nadziemnej Rys. 4.63 (zarówno fragmentu przekroju poprzecznego jak i podłużnego) oraz działek okwiatu Rys. 4.64. Obie kultury zostały założone dnia 16 kwietnia (lewa część zdjęcia) oraz sfotografowane w dniu 22 czerwca (prawa część zdjęcia). Eksplantaty łodygowe zmieniły kolor na ciemnobrunatny, natomiast te pochodzące z działek okwiatu nie uległy większym przekształceniom.

Świadczy to o tym, że skład pożywki (w szczególności rodzaj oraz stężenie regulatorów wzrostu) zostały dobrane w sposób nieodpowiedni do eksplantatów tego typu. Widać zatem, że dla eksplantatów różnego pochodzenia, konieczne jest opracowanie oddzielnich składów pożywek.



Rys. 4.62. Śnieżycę karpacką, kultura z eksplantatami liściowymi w dniu założenia (po lewej) oraz w dniu 11 maja (po prawej)



Rys. 4.63. Szachownica kostkowata, kultura z eksplantatami łodygowymi w dniu założenia (po lewej) oraz w dniu 22 czerwca (po prawej)



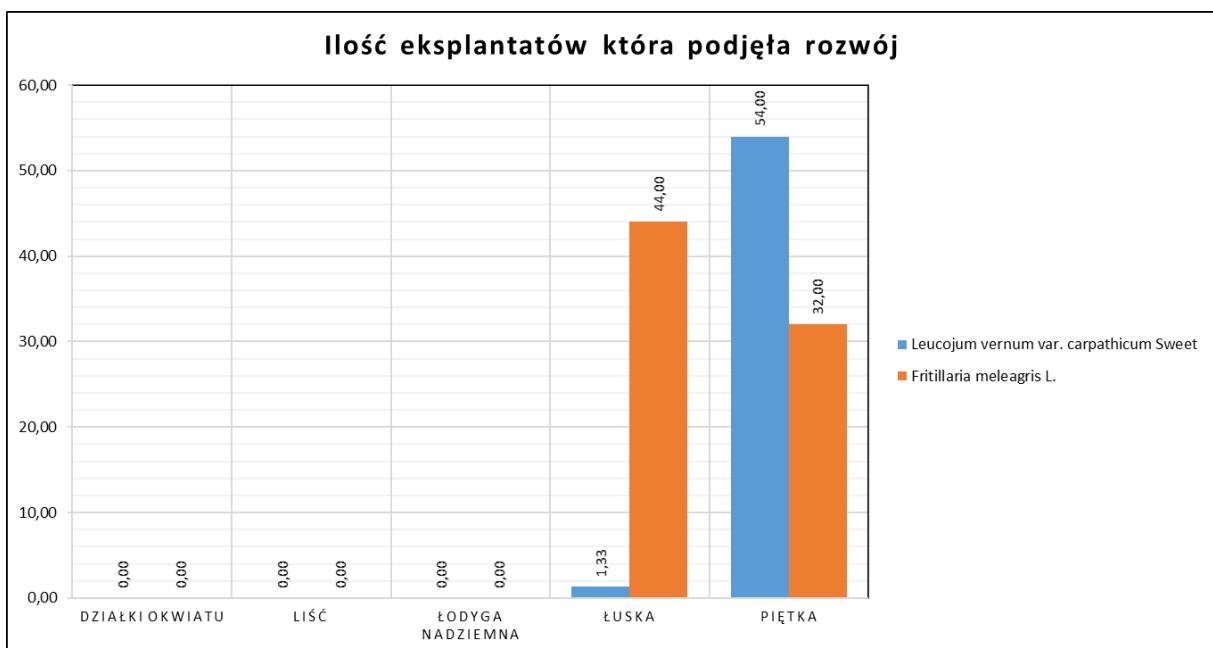
Rys. 4.64. Szachownica kostkowata, kultura z eksplantatami pochodzącymi z działek okwiatu w dniu założenia (po lewej) oraz w dniu 22 czerwca (po prawej)

4.2.5. Ilość eksplantatów, która podjęła regenerację oraz czas potrzebny do pojawienia się regeneratów w kulturach

Ważną informacją jest ilość eksplantatów która podjęła rozwój. W Tab. 4.6 zestawiono sumaryczne dane dla obu gatunków, wraz z podziałem na rodzaj eksplantatu. Na wykresie kolumnowym przedstawiono graficzną reprezentację tych danych – Rys. 4.65.

Tab. 4.6. Ilość eksplantatów która podjęła regenerację.

Gatunek	Źródło eksplantatu	Ilość wyłożonych eksplantatów	Eksplantaty które podjęły rozwój	
			[szt]	[%]
<i>Leucojum vernum var. carpathicum</i> Sweet	Liść	150	0	0,00
	Łuska	150	2	1,33
	Piętka	150	81	54,00
<i>Fritillaria meleagris</i> L.	Działki okwiatu	20	0	0,00
	Liść	50	0	0,00
	Łodyga nadziemna	50	0	0,00
	Łuska	125	55	44,00
	Piętka	50	16	32,00



Rys. 4.65. Ilość eksplantatów która podjęła rozwój

Pominięto dane z kultur ratunkowych, dodatkowo warto zaznaczyć, że uwzględnione zostały wszystkie eksplantaty, które podjęły regenerację, również te które w późniejszym okresie doświadczenia uległy zakażeniom. Dla obu gatunków regenerację podjęły jedynie eksplantaty pochodzące z łuski spichrzowej oraz piętki. W przypadku śnieżycy karpackiej regenerację podjęło 54,00% eksplantatów pochodzących z piętki i jedynie 1,33% eksplantatów

pochodzących z łuski spichrzowej. Świadczy to o tym, że pożywka oraz warunki prowadzenia kultury były dobrane znacznie lepiej pod eksplantaty pochodzące z piętki.

W przypadku szachownicy kostkowej wzrost podjęto 32,00% eksplantatów pochodzących z piętki oraz 44,00% eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej co można uznać za wynik zadowalający. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na małą wielkość piętki u szachownicy, eksplantaty pochodzące od piętki zawierały często fragment łuski spichrzowej.

W Tab. 4.7 oraz Tab. 4.8 zestawiono czas prowadzenia kultury (dniach) w poszczególnych dniach obserwacji. W przypadku śnieżycy karpackiej kultury były zakładane w 6 turach, z czego ostatnią to jest 20 kwietnia, pominięto ze względu na to, że tego dnia założono jedynie kultury ratunkowe a więc kultury z eksplantatów, które znajdowały się już wcześniej w innych kulturach, które uległy częściowemu zakażeniu. Obserwację w przypadku śnieżycy karpackiej przeprowadzono w sumie 7-krotnie, 15 marca, 23 marca, 6 kwietnia, 16 kwietnia, 20 kwietnia, 27 kwietnia oraz 11 maja.

Tab. 4.7. Czas prowadzenia kultury w dniu obserwacji dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

<i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet	Data obserwacji						
	16 marca	23 marca	6 kwietnia	16 kwietnia	20 kwietnia	27 kwietnia	11 maja
Data założenia kultury	9 marca	8	15	29	39	43	50
	16 marca	-	8	22	32	36	43
	23 marca	-	-	15	25	29	36
	6 kwietnia	-	-	-	11	15	22
	16 kwietnia	-	-	-	-	5	12
	20 kwietnia	-	-	-	-	-	8
							22

W przypadku szachownicy kostkowej kultury zakładano w trzech turach, obserwację przeprowadzono 5-krotnie, 20 kwietnia, 27 kwietnia, 11 maja, 25 maja oraz 22 czerwca.

Tab. 4.8. Czas prowadzenia kultury w dniu obserwacji dla *Fritillaria meleagris* L.

<i>Fritillaria meleagris</i> L.	Data obserwacji				
	20 kwietnia	27 kwietnia	11 maja	25 maja	22 czerwca
Data założenia kultury	16 kwietnia	5	12	26	40
	27 kwietnia	-	-	15	29
	11 maja	-	-	-	15
					43

Unikalne wartości ilości dni, które upłynęły od czasu założenia kultury w poszczególnej turze do czasu obserwacji z Tab. 4.7 oraz Tab. 4.8 zestawiono w Tab. 4.9 i na ich podstawie określono przedziały obserwacji. Sumarycznie przyjęto 9 przedziałów, każdy z nich obejmuje okres około tygodnia. Wartości przyjętych przedziałów można znaleźć w Tab. 4.9.

Tab. 4.9. Przyjęte przedziały obserwacji rozwoju eksplantatów.

Unikalna wartość z Tab. 4.7 oraz Tab. 4.8	Zakres przyjętego przedziału obserwacji	Nazwy przyjętego przedziału obserwacji
5	5-8 dni	około I tygodnia
8		
11	11-15 dni	około II tygodni
12		
15	22-25 dni	około III tygodni
22		
25	26-29 dni	około IV tygodni
26		
29	32-36 dni	około V tygodni
32		
36		
39	39-43	około VI tygodni
40		
43		
50	50	około VII tygodni
57	57	około VIII tygodni
64	64-65	około IX tygodni
65		

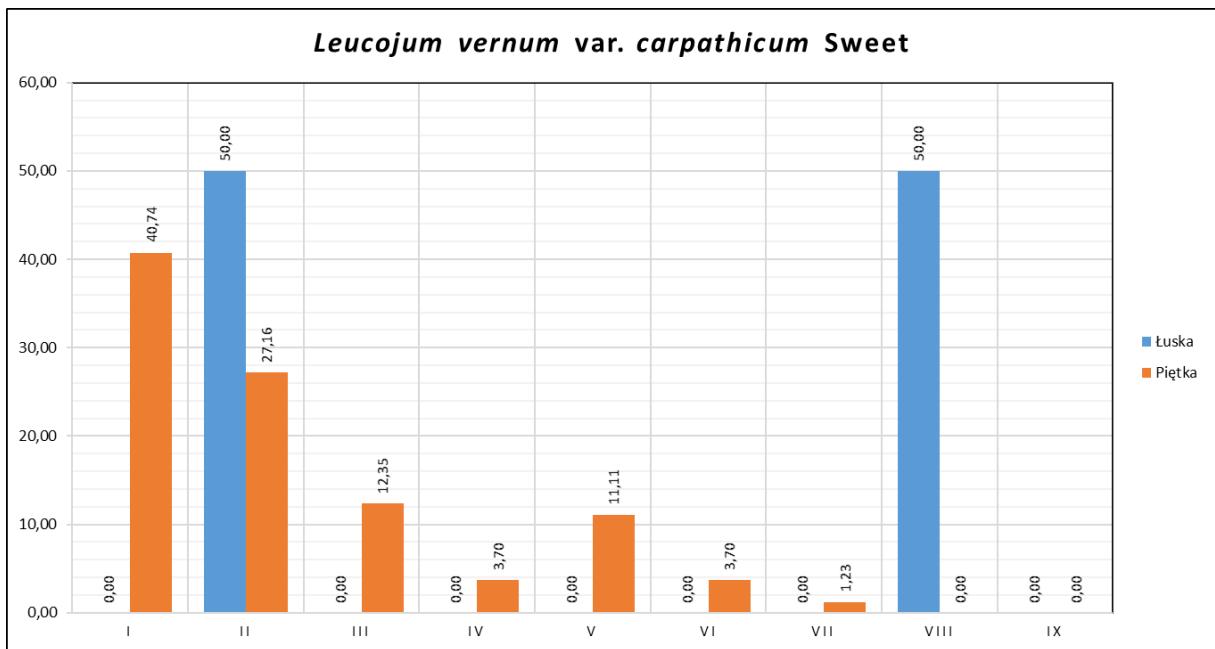
Wartości tych przedziałów zostały wykorzystane do przygotowania opracowania dotyczącego czasu potrzebnego do pojawienia się pierwszych regeneratów na danym eksplantacie. Opracowane dane zebrano w Tab. 4.10 oraz zwizualizowano w postaci wykresów kolumnowych na Rys. 4.66 dla śnieżycy karpackiej oraz Rys. 4.67 dla szachownicy kostkowej. Na osi odciętych zestawiono wartości konkretnych przedziałów, natomiast na osi rzędnych przyrost eksplantatów które wykazały regenerację od ostatniej obserwacji. Oddzielne wykresy zestawiono dla eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej oraz piętki.

W przypadku śnieżycy karpackiej i eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej połowa eksplantatów, która w ogóle podjęła wzrost podjęła go po około 2 tygodniach od założenia kultury, natomiast druga połowa po około 8 tygodniach od założenia kultury. Należy jednak zauważyć, że jedynie 1,33% procenta wyłożonych eksplantatów, a dokładniej 2 eksplantaty podjęły regenerację, stąd próbka jest bardzo mała i nie można na jej podstawie podejmować jakichkolwiek wniosków. Dla eksplantatów pochodzących od piętki większość eksplantatów, która podjęła regenerację, podjęła ją w pierwszych dwóch tygodniach po założeniu kultury – 60,79% eksplantatów. Jest to kolejno 40,74% w pierwszych tygodniu po założeniu kultury i 27,16% w drugim tygodniu po założeniu kultury. W następnych tygodniach

ilość eksplantatów która podjęła regenerację sukcesywnie spadała, było to 12,35% w III tygodniu prowadzenia kultury, 3,70 w IV tygodniu prowadzenia kultury, 11,11% w V tygodniu prowadzenia kultury, 3,70% w VI tygodniu prowadzenia kultury, 1,23% w VII tygodniu prowadzenia kultury. W VIII oraz IX żaden dodatkowy eksplantat nie podjął regeneracji.

Tab. 4.10. Przyrost ilości eksplantatów które podjęły regenerację w czasie kolejnych obserwacji.

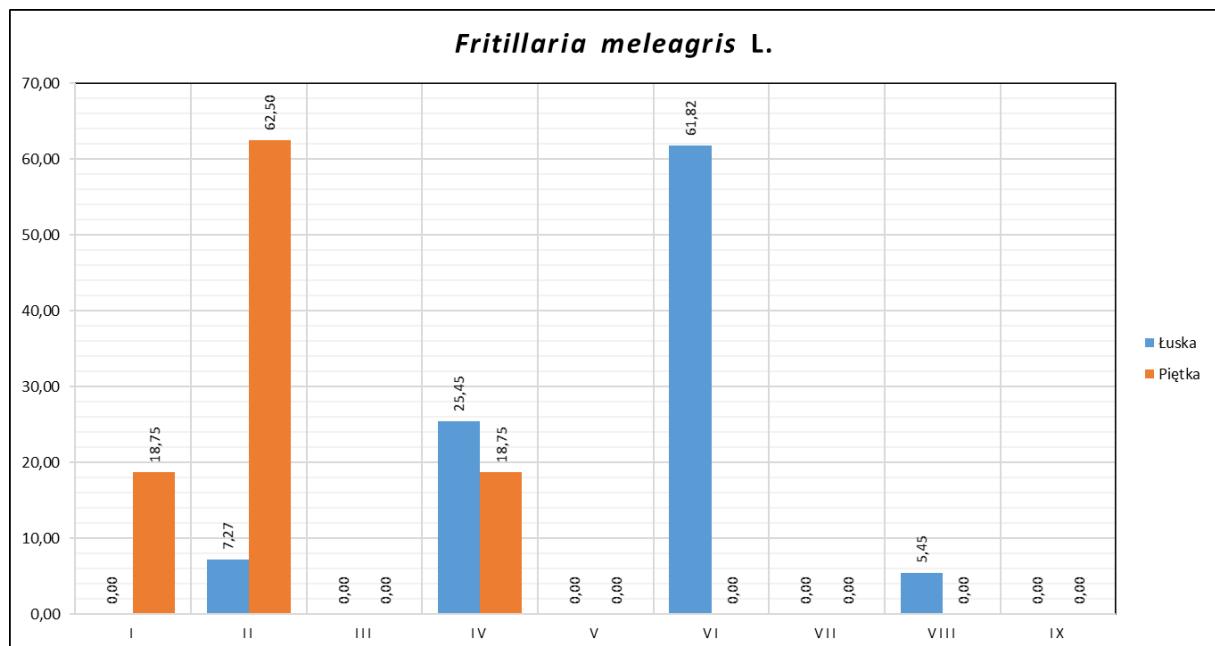
Gatunek		Przedział obserwacji (około X tygodni)									Suma
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
<i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpathicum</i> Sweet	Łuska	[szt]	0	1	0	0	0	0	1	0	2
		[%]	0,00	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	0,00	
	Piętka	[szt]	33	22	10	3	9	3	1	0	81
		[%]	40,74	27,16	12,35	3,70	11,11	3,70	1,23	0,00	
<i>Fritillaria meleagris</i> L.	Łuska	[szt]	0	4	-	14	-	34	-	3	55
		[%]	0,00	7,27	-	25,45	-	61,82	-	5,45	
	Piętka	[szt]	3	10	-	3	-	0	-	0	16
		[%]	18,75	62,50	-	18,75	-	0,00	-	0,00	



Rys. 4.66. Czas do pojawienia się regeneratów w kulturach *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

W przypadku szachownicy kostkowej i eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej większość eksplantatów która w ogóle podjęła regenerację, podjęła go w V oraz VI tygodniu prowadzenia kultury – 61,82%. Należy zaznaczyć, że rozdzielcość obserwacji nie pozwala stwierdzić ile eksplantatów podjęło rozwój w V a ile w VI tygodniu prowadzenia kultury (brak obserwacji w V tygodniu prowadzenia kultury). Dane z obu tygodni zagregowano w przyroście

z VI tygodnia obserwacji. Stosunkowo dużo eksplantatów podjęło również regenerację w III i IV tygodniu prowadzenia kultury – 25,45%. Podobnie jak poprzednio ze względu na rozdzielcość czasu obserwacji przyrost z III i IV tygodnia zagregowano w odczycie z IV tygodnia. Niewielka część eksplantatów podjęła regenerację również w II tygodniu – 7,27% oraz VII i VIII tygodniu – 5,45%. Dla eksplantatów pochodzących od piętki większość eksplantatów, która w ogóle podjęła regenerację, podjęła go w II tygodniu – 62,50%. Część eksplantatów podjęła wzrost również w I tygodniu – 18,75% oraz IV tygodniu prowadzenia kultury 18,75%.



Rys. 4.67. Czas do pojawienia się regeneratów w kulturach *Fritillaria meleagris* L.

W publikacji [17] przedstawiono wyniki uzyskane po I etapie doświadczenia. Dla eksplantatów pochodzących od liści 21,37% eksplantatów podjęło regenerację (35,32% dla pochew liściowych, 1,05% dla wierzchołków liścia, 47,22% dla młodych liści). Jest to wynik znacznie lepszy niż ten uzyskany w niniejszym doświadczeniu dla śnieżycy karpackiej. Dla eksplantatów pochodzących od fragmentów cebuli uzyskano 10,37% eksplantatów, które podjęły regenerację co jest wynikiem znacznie słabszym niż wyniki dla eksplantatów pochodzących z piętki oraz lepszym niż w przypadku eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej w niniejszym doświadczeniu. Pożywka oraz warunki prowadzenia kultury były podobne, stąd można dojść do wniosku, że kluczowym aspektem mogły być różnice gatunkowe. W publikacji [17] badanym gatunkiem była śnieżycy letnia, nie śnieżycy karpacka.

Dla *Fritillaria meleagris* L. w żadnej z wymienionych w przeglądzie literatury publikacji nie przedstawiono wyników do których można by się odnieść.

4.2.6. Wpływ rodzaju eksplantatu na ilość uzyskanych regeneratów

Właściwie podstawową zależnością, którą chciano sprawdzić było zbadanie wpływu rodzaju eksplantatu na ilość uzyskanych regeneratów. Zależność ta prawdziwa jest dla konkretnego typu pożywki oraz konkretnej metody mikrorozmnażania (tutaj organogeneza bezpośrednia) i mówi nam jak dobrze dana pożywka dobrana jest pod kątem konkretnej metody mikrorozmnażania oraz rodzaju eksplantatu. Nie bez znaczenia pozostają również inne czynniki takie jak warunki prowadzenia kultury (temperatura, intensywność naświetlenia, długość dnia itp.). Ze względu na fakt, iż dla każdego z gatunków użyto innej pożywki, dane dla obu gatunków należy rozpatrywać rozdzielnie. Na potrzeby omówienia wyników wprowadzono pojęcie efektywności regeneracyjnej eksplantatu. Mówi nam ono ile regeneratów otrzymujemy na każdy wyłożony eksplantat. Przygotowano dwa zestawienia, jedno uwzględniając wszystkie wyłożone eksplantaty oraz drugie, uwzględniające jedynie te eksplantaty, które nie uległy zakażeniu.

Pierwsza daje nam swojego rodzaju rzeczywistą efektywność regeneracyjną, innymi słowy mówi nam ile eksplantatów musimy wyłożyć aby uzyskać określona liczbę regeneratów z uwzględnieniem skuteczności zastosowanych metod odkażania. Druga wartość mówi nam o swojego rodzaju potencjalnej efektywności regeneracyjnej, czyli daje nam informację o efektywności regeneracyjnej jaką jesteśmy w stanie uzyskać po opracowaniu metod odkażania, które wyeliminują nam zakażenia z kultur.

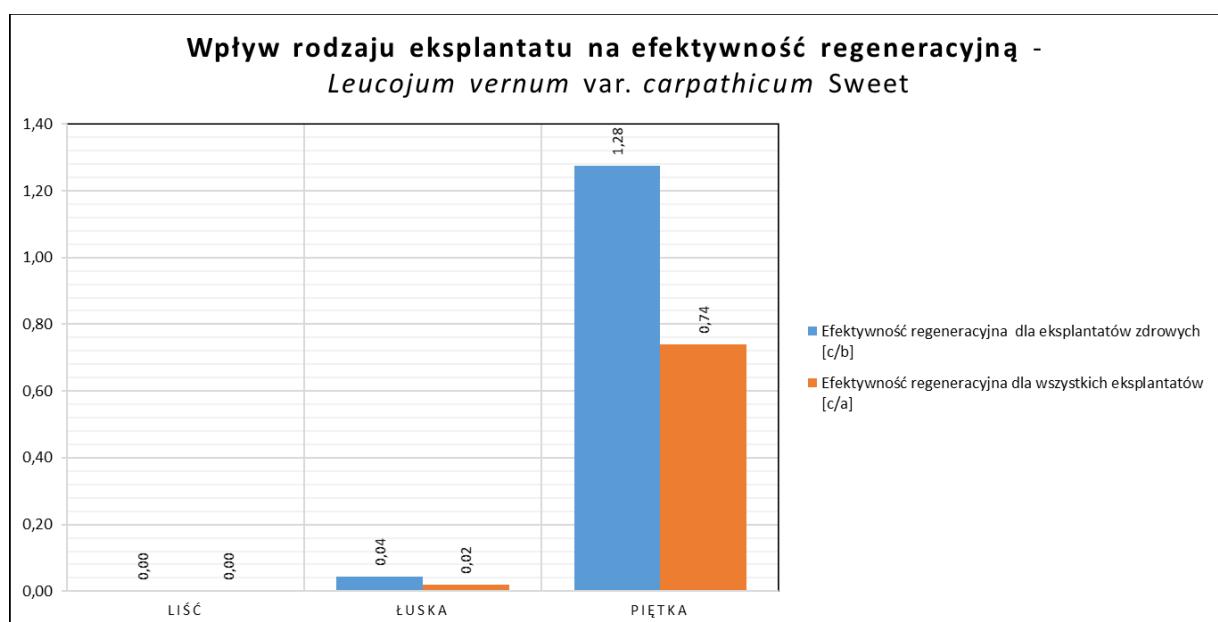
Tab. 4.11 Wpływ rodzaju eksplantatu na efektywność regeneracyjną.

Gatunek	Źródło eksplantatu	Ilość wyłożonych eksplantatów [a]	Ilość eksplantatów bez zakażeń [b]	Ilość otrzymanych regeneratów [c]	Efektywność regeneracyjna dla eksplantatów zdrowych [c/b]	Efektywność regeneracyjna dla wszystkich eksplantatów [c/a]
Śnieżyca karpacka	Liść	150	63	0	0,00	0,00
	Łuska	150	69	3	0,04	0,02
	Piętka	150	87	111	1,28	0,74
Szachownica kostkowata	Działki okwiatu	20	14	0	0,00	0,00
	Liść	50	45	0	0,00	0,00
	Łodyga nadziemna	50	37	0	0,00	0,00
	Łuska	125	85	191	2,25	1,53
	Piętka	50	18	40	2,22	0,80

I tak dla śnieżycy karpackiej użyto pożywki 'MS SK2', której skład oraz właściwości przedstawiono w rozdziale 3.1.2.1. Zbiorcze dane zebrano w Tab. 4.11, szczegółowe są dostępne w Załącznik 4. Regeneraty dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet pojawiły

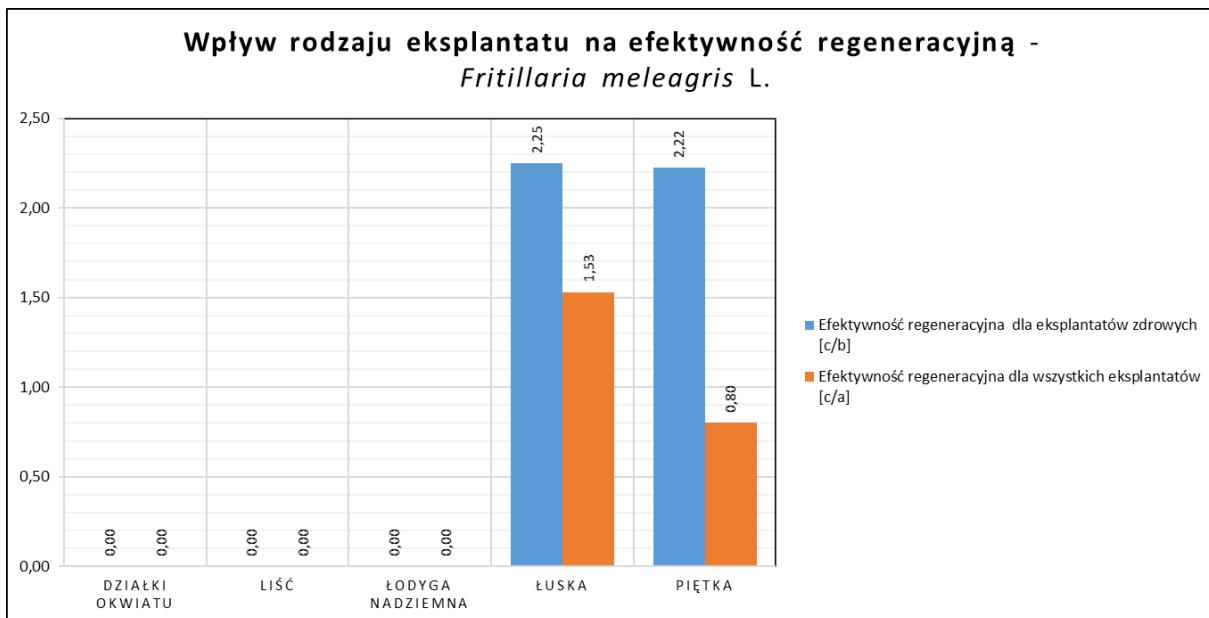
się jedynie na eksplantatach pochodzących z łuski spichrzowej oraz piętki. W przypadku łuski spichrzowej zarówno rzeczywista jak i potencjalna efektywność regeneracyjna były bardzo niska. Rzeczywista wyniosła jedynie 0,02 regeneratu na każdy wyłożony eksplantat, natomiast potencjalna była niewiele wyższa bo 0,04. W przypadku eksplantatów pochodzących od piętki efektywność regeneracyjna była znacznie wyższa, rzeczywista wyniosła 0,74, natomiast potencjalna 1,28. Dane zwizualizowano za pomocą wykresu kolumnowego przedstawionego na Rys. 4.68.

Można zatem stwierdzić iż wykorzystana pożywka jest odpowiednia do rozmnażania metodą organogenezy bezpośredniej jedynie dla eksplantatów pochodzących z piętki. Należy również zaznaczyć, że wykorzystana pożywka była pożywką dedykowaną dla śnieżycy letniej *Leucojum aestivum* L., stąd prawdopodobnie jej skład jest wciąż daleki od optymalnego jeśli chodzi o śnieżycę karpacką nawet dla eksplantatów pochodzących od piętki.



Rys. 4.68 Wpływ rodzaju eksplantatu na zdolność regeneracyjną - *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Dla szachownicy kostkowej zastosowano pożywkę 'MS SK', której skład przedstawiono w rozdziale 3.2.2.1. Zbiorcze dane zebrano w Tab. 4.11, szczegółowe w Załącznik 5. Podobnie jak w przypadku śnieżycy karpackiej, dla *Fritillaria meleagris* L. regeneraty pojawiły się jedynie na eksplantatach pochodzących z łuski oraz piętki. Dane zwizualizowano na wykresie kolumnowym przedstawionym na Rys. 4.69.



Rys. 4.69 Wpływ rodzaju eksplantatu na zdolność regeneracyjną *Fritillaria meleagris* L.

Dla eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej rzeczywista efektywność regeneracyjna wyniosła 1,53, potencjalna 2,25. W przypadku eksplantatów pochodzących od piętki, rzeczywista efektywność regeneracyjna wyniosła 0,80, natomiast potencjalna 2,22. Widać zatem, że gdyby wyeliminować lub przynajmniej ograniczyć ilość zakażeń dla eksplantatów pochodzących od piętki to okazuje się, że pożywka jest równie dobra dla eksplantatów łuskowych jak i tych pochodzących od piętki. Skład pożywki został zaczerpnięty z doświadczenia na *Fritillaria meleagris* L. w publikacji [20].

W przypadku *Fritillaria meleagris* L. efektywność regeneracyjna potencjalna była wyższa niż w przypadku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet. Świadczy to o tym, że skład pożywki w przypadku *Fritillaria meleagris* L. jest bliższy optymalnego dla tej metody mikrorozmnażania i tego rodzaju eksplantatu (piętka oraz łuska spichrzowa).

W publikacji [17] przedstawiono wyniki uzyskane po I etapie doświadczenia. Dla eksplantatów pochodzących od liści rzeczywista efektywność regeneracyjna wyniosła 0,87 (1,48 dla pochew liściowych, 0,02 dla wierzchołków liścia, 1,93 dla młodych liści). Jest to wynik znacznie lepszy niż ten uzyskany w niniejszym doświadczeniu dla śnieżyicy karpackiej. Dla eksplantatów pochodzących od fragmentów cebuli uzyskano rzeczywistą efektywność regeneracyjną na poziomie 0,28 co jest wynikiem znacznie słabszym niż wyniki dla eksplantatów pochodzącym z piętki oraz lepszym niż w przypadku eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej w niniejszym doświadczeniu. Pożywka oraz warunki prowadzenia kultury były podobne, stąd można dojść do wniosku, że kluczowym aspektem mogły być różnice gatunkowe. W publikacji [17] badanym gatunkiem była śnieżyca letnia, nie śnieżyca karpacka.

Dla *Fritillaria meleagris* L. w żadnej z wymienionych w przeglądzie literatury publikacji nie przedstawiono wyników do których można by się odnieść.

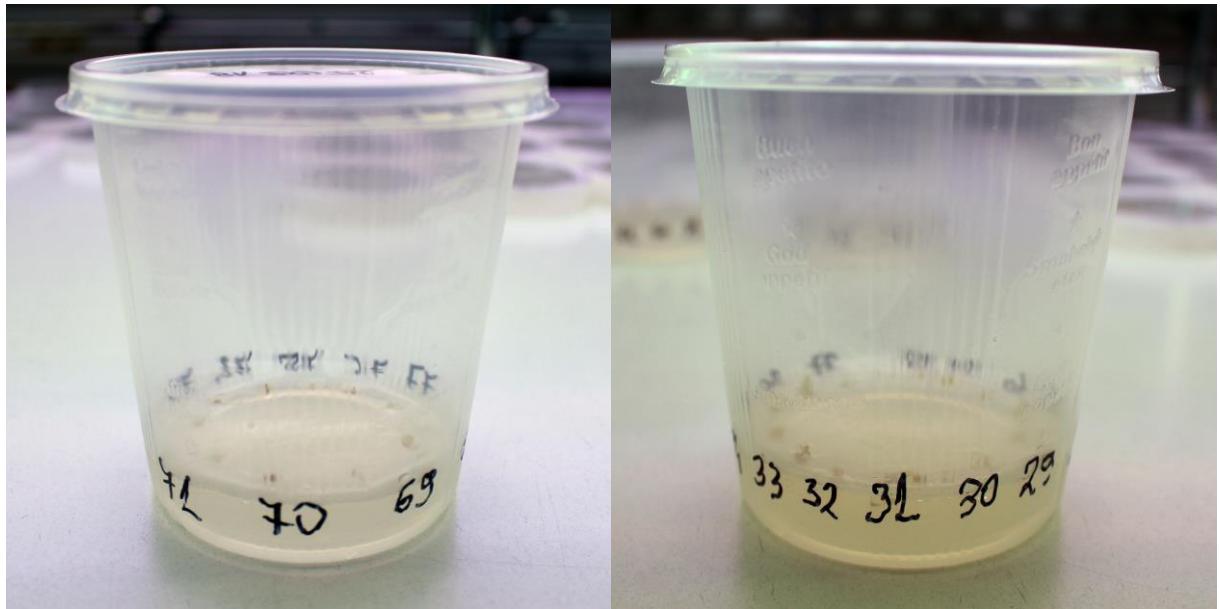
4.3. Wynik doświadczenia z nasionami *Fritillaria meleagris* L.

W przypadku szachownicy kostkowej przeprowadzono dodatkowe doświadczenie z nasionami. Celem było użycie siewek jako materiału bazowego do założenia kultury. Metodykę, w tym skład pożywki, warunki oraz czas prowadzenia kultury omówiono wspólnie z metodyką badań dla pozostałych rodzajów eksplantatów pochodzących od szachownicy kostkowej w rozdziale 3.2.

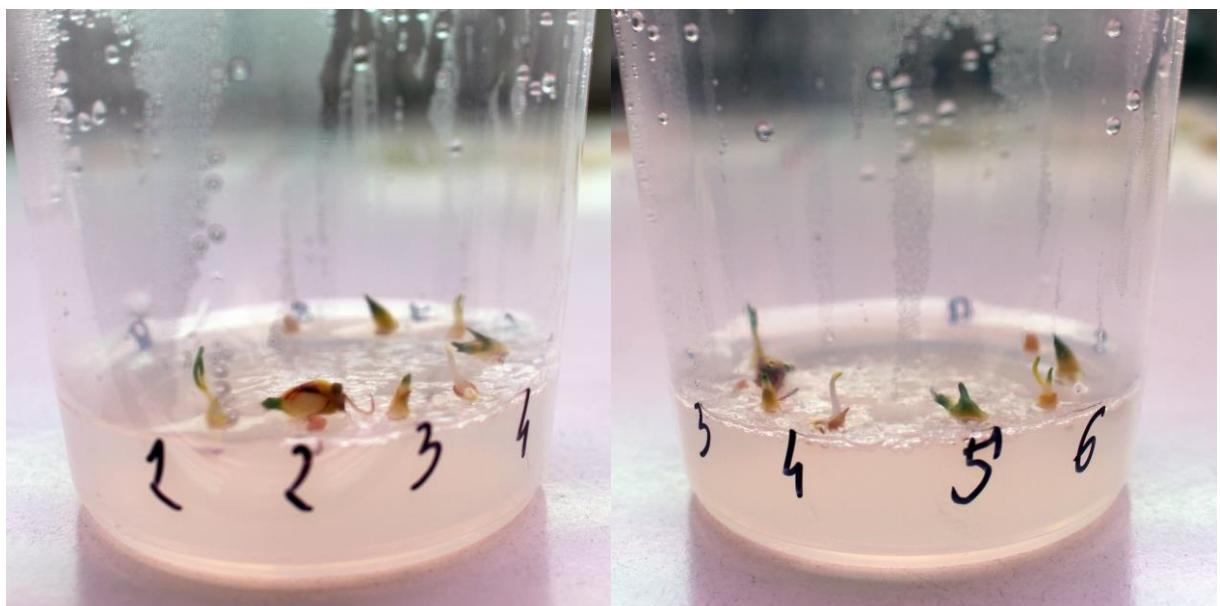
Sumarycznie żadne z 16 wyłożonych nasion nie skiełkowało przez cały czas prowadzenia kultury a więc 16 tygodni – Tab. 3.13. Prawdopodobną przyczyną były nieodpowiednie warunki oraz zbyt krótki czas prowadzenia kultury. Według [25], nasiona szachownicy kiełkują kiedy traktowane są temperaturą poniżej 5°C. Co więcej nawet w optymalnej temperaturze, pierwsze siewki pojawiają się dopiero po okresie około 29 tygodni od wysiewu.

4.4. Rozwój regeneratów III etapie mikrorozmnażania

III etap dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet rozpoczął się dnia 25 maja 2018 roku i zakończył 14 grudnia 2018 roku. Trwał więc około 29 tygodni. Obserwacje przeprowadzono dnia 25 maja, w chwili rozpoczęcia III etapu (Rys. 4.70), 06 listopada (Rys. 4.71) oraz 14 grudnia 2018 roku w dniu zakończenia III etapu (Rys. 4.72). Rozwój przykładowych kultur przedstawiono w postaci fotograficznej.



Rys. 4.70. Regeneraty *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w dniu rozpoczęcia III etapu – 25 maja 2018



Rys. 4.71. Regeneraty *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet – obserwacja 06 listopada 2018



Rys. 4.72. Regeneraty *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet – obserwacja 14 grudnia 2018

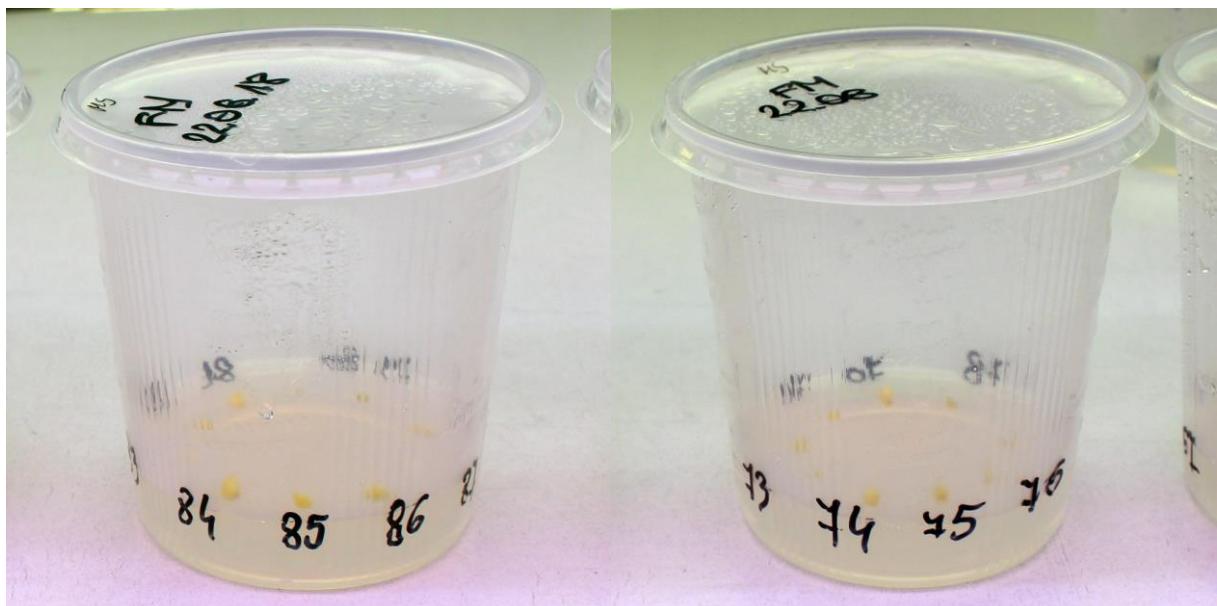
III etap dla *Fritillaria meleagris* L. rozpoczął się dnia 22 czerwca 2018 roku i zakończył 14 grudnia 2018 roku. Trwał więc około 24-25 tygodni. Obserwacje przeprowadzono dnia 22 czerwca w dniu rozpoczęcia III etapu (Rys. 4.73), 06 listopada (Rys. 4.74) oraz 14 grudnia 2018 w dniu zakończenia roku (Rys. 4.75). Rozwój przykładowych kultur przedstawiono w postaci fotograficznej.

Regeneraty obu gatunków rosły oraz ukorzeniały się bardzo słabo. Po 24-25 tygodniach prowadzenia III etapu przyrost wyniósł około 1-2 cm i to tylko w przypadku części regeneratów. Regeneraty u których wystąpiła organogeneza pędowa ukorzeniły się w bardzo niewielkim stopniu. Regeneraty u których wystąpiła organogeneza korzeniowa nie wytworzyły pędu. Dodatek regulatorów wzrostu do pożywki pod koniec III etapu miał pozytywny efekt na wzrost regeneratów. Wydaje się, że zasadnym byłoby dodanie regulatorów wzrostu już na samym początku III etapu doświadczenia.

Kilka kultur uległo zakażeniu, były to jednak zakażenia wtórne, spowodowane prawdopodobnie błędami podczas pracy pod komorą laminarną przy przekładaniu regeneratów na świeżą pożywkę. Przykład takiej kultury przedstawiono na Rys. 4.76.

Publikacja [17] daje kilka wskazówek, które mogą sugerować jaki był powód bardzo słabego wzrostu regeneratów *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w III etapie mikrorozmnażania. Pierwszym z nich może być brak regulatorów wzrostu w pożywce

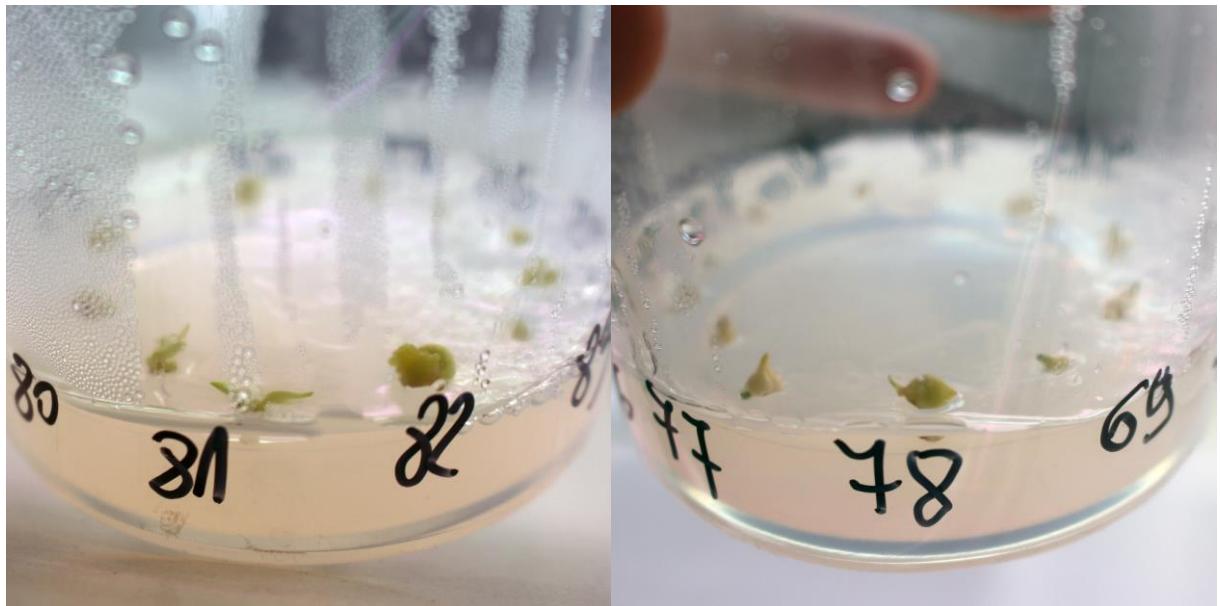
(regulatory były dodane dopiero pod koniec trwania III etapu), natomiast w publikacji użyto pożywki z niewielką zawartością – 0,1 NAA, kinetyny oraz BAP przez cały czas trwania III etapu. Drugim z nich może być fakt, że w [17] regeneraty w czasie właściwym dla okresu spoczynku śnieżycy letniej nie wykazywały wzrostu. Etap III dla śnieżycy karpackiej trwał od 25.05.2018 do 14.12.2018, obejmował on więc w dużej części okres spoczynku właściwy dla śnieżycy karpackiej. Prawdopodobnie była to kolejna (być może główna) przyczyna zahamowanego wzrostu regeneratów. Trzecim powodem mógł być zbyt krótki czas prowadzenia kultur w czasie aktywności fizjologicznej gatunku. Dla śnieżycy letniej w [17] był to okres 5-6 miesięcy, w III etapie doświadczenia z *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet można przyjąć, że trwał on 1-1,5 miesiąca. Być może przedłużenie doświadczenia III etapu dałoby odpowiedź na pytanie, które czynnik był kluczowy. Obecnie nie można tego stwierdzić, zostawia to pole do dalszych doświadczeń. W przypadku ukorzeniania, kluczowym aspektem było prawdopodobnie zastosowanie przez pierwsze 4-6 tygodni obniżonej temperatury – 5°C w publikacji [17]. Pozwala to wysunąć wniosek, że regeneraty *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet w temperaturze 25 ± 2 °C ukorzenią się słabo i konieczne jest działanie niską temperaturą w celu pobudzenia regeneratów do wytworzenia korzeni. Należy jednak zaznaczyć, że [17] opisyswała doświadczenie wykonane na innym gatunku *Leucojum aestivum* L., i powody bardzo słabego wzrostu i ukorzeniania regeneratów *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet mogą być zupełnie inne. Konieczne są tutaj dodatkowe doświadczenia.



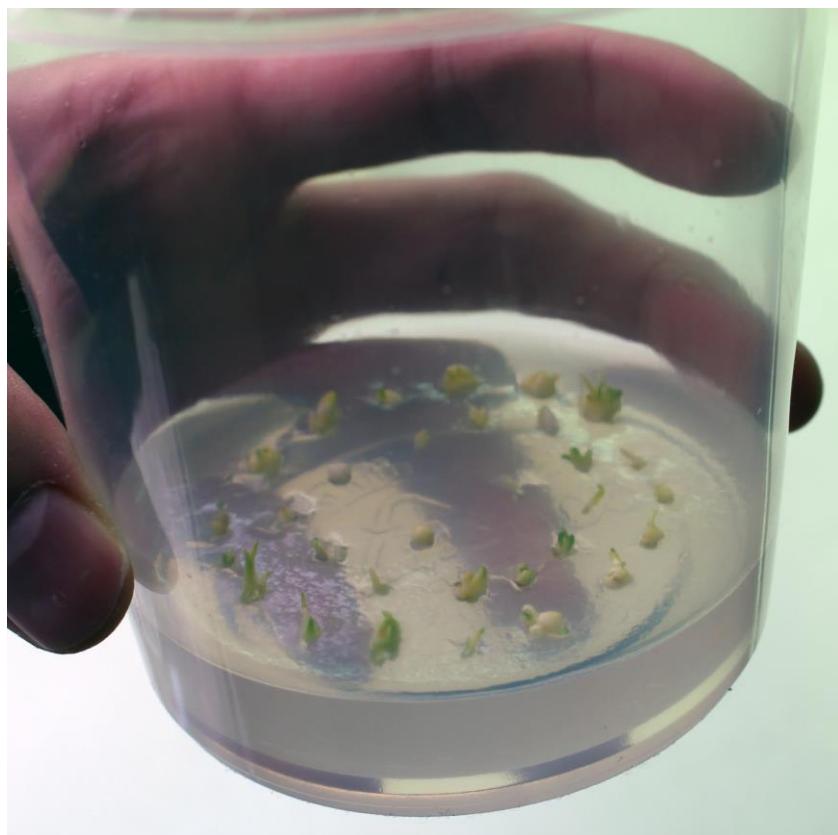
Rys. 4.73. Regeneraty *Fritillaria meleagris* L. w dniu rozpoczęcia III etapu – 22 czerwca 2018

W przypadku szachownicy kostkowej, w [22] prowadzono kultury podobnie jak w niniejszym doświadczeniu na pożywce MS bez dodatków hormonów wzrostu. Temperatura prowadzenia kultur była również podobna, z tą różnicą, że w późniejszym czasie doświadczenia zostało obniżone do 4°C. Obniżona temperatura miała prawdopodobnie na celu stymulację ukorzeniania. Prawdopodobnie ważny czynnikiem był okres w którym prowadzony był III etap (22.06.2018/29.06.2018 – 14.12.2018), który podobnie jak w przypadku śnieżycy karpackiej

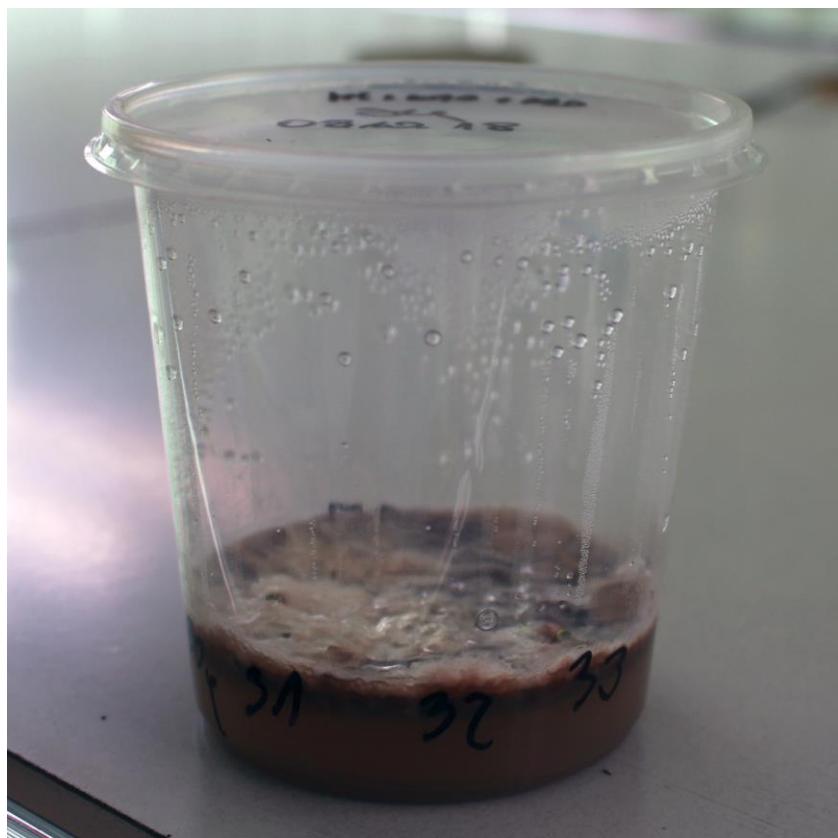
obejmował okres spoczynku właściwy dla szachownicy kostkowej. Podobnie jak w przypadku pierwszego gatunku, tak i tutaj pozostaje spore pole do dalszych doświadczeń.



Rys. 4.74. Regeneraty *Fritillaria meleagris* L. obserwacja w dniu – 06 listopada 2018



Rys. 4.75. Regeneraty *Fritillaria meleagris* L. – obserwacja 14 grudnia 2018



Rys. 4.76. Zakażona kultura w III etapie doświadczenia – obserwacja 16 listopada 2018

4.5. Żywotność pyłku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Dodatkowym doświadczeniem było badanie żywotności pyłku śnieżycy karpackiej. W rozdziale 3.1.6 opisano motywację oraz sposób wykonania badania.

Dane z badania z użyciem barwnika Aleksandra dla obu preparatów zestawiono w Tab. 4.12. Dla obu preparatów żywotność pyłku była bardzo wysoka, wyniosła 98,29% dla pierwszego preparatu oraz 98,68% dla drugiego preparatu co dało średnią na poziomie 98,49%. Dane z badania z użyciem acetokarminu dla obu preparatów zestawiono w

Tab. 4.13. Dla obu preparatów żywotność pyłku była również bardzo wysoka, wyniosła 94,92% dla pierwszego preparatu oraz 95,74% dla drugiego preparatu co dało średnią na poziomie 95,33%.

W przypadku obu metod żywotność ziaren pyłku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet przekroczyła 95% co pozwala stwierdzić, że pyłek śnieżycy karpackiej jest bardzo żywotny i nie jest to na pewno czynnik ograniczający występowanie gatunku.

Tab. 4.12. Wyniki badania żywotności pyłku z wykorzystaniem barwnika Aleksandra.

Indeks badanego pola widzenia	Ilość żywych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość martwych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość ziaren pyłku w polu widzenia [szt]
Preparat 1			
1	23	1	24
2	14	0	14
3	16	0	16
4	31	0	31
5	5	1	6
6	6	0	6
7	36	0	36
8	42	1	43
9	75	2	77
10	16	0	16
11	14	0	14
12	46	0	46
13	21	1	22
Suma [szt]	345	6	351
Żywotność pyłku [%]	98,29		
Preparat 2			
1	6	0	6

2	9	0	9
3	13	0	13
4	12	0	12
5	7	0	7
6	13	0	13
7	7	1	8
8	12	0	12
9	66	0	66
10	4	1	5
11	9	0	9
12	10	0	10
13	8	0	8
14	12	0	12
15	6	1	7
16	69	1	70
17	7	0	7
18	13	0	13
19	17	0	17
Suma [szt]	300	4	304
Żywotność pyłku [%]		98,68	
Średnia żywotność pyłku [%]		98,49	

Tab. 4.13. Wyniki badania żywotności pyłku z wykorzystaniem acetokarminu.

Indeks badanego pola widzenia	Ilość żywych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość martwych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość ziaren pyłku w polu widzenia [szt]
Preparat 1			
1	16	0	16
2	16	0	16
3	17	1	18
4	26	0	26
5	29	0	29
6	15	1	16
7	41	1	42

8	18	0	18
9	19	0	19
10	13	0	13
11	19	1	20
12	27	0	27
13	19	3	22
14	13	3	16
15	8	2	10
16	9	3	12
17	31	3	34
Suma [szt]	336	18	354
Żywotność pyłku [%]		94,92	
Preparat 2			
1	18	2	20
2	9	0	9
3	25	2	27
4	12	0	12
5	16	0	16
6	23	1	24
7	17	1	18
8	18	0	18
9	31	0	31
10	14	1	15
11	19	0	19
12	12	2	14
13	9	0	9
14	12	0	12
15	22	1	23
16	18	1	19
17	17	0	17
18	23	3	26
Suma [szt]	315	14	329
Żywotność pyłku [%]		95,74	

Średnia żywotność pyłku [%]	95,33
--------------------------------	-------

4.6. Żywotność pyłku *Fritillaria meleagris L.*

Dodatkowym doświadczeniem było badanie żywotności pyłku śnieżycy karpackiej. W rozdziale 3.2.6 opisano motywację oraz sposób wykonania badania.

Dane z badania z użyciem barwnika Aleksandra dla obu preparatów zestawiono w Tab. 4.14. Dla obu preparatów żywotność pyłku była bardzo wysoka, wyniosła 93,06% dla pierwszego preparatu oraz 92,42% dla drugiego preparatu co dało średnią na poziomie 92,74%. Dane z badania z użyciem acetokarminu dla obu preparatów zestawiono w Tab. 4.15. Dla obu preparatów żywotność pyłku była również bardzo wysoka, wyniosła 95,57% dla pierwszego preparatu oraz 98,44% dla drugiego preparatu co dało średnią na poziomie 97,01%.

W przypadku obu metod żywotność ziaren pyłku *Fritillaria meleagris L.* przekroczyła 90% co pozwala stwierdzić, że pyłek szachownicy kostkowej jest bardzo żywotny i nie jest to na pewno czynnik ograniczający występowanie gatunku.

Tab. 4.14. Wyniki badania żywotności pyłku z wykorzystaniem barwnika Aleksandra.

Indeks badanego pola widzenia	Ilość żywych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość martwych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość ziaren pyłku w polu widzenia [szt]
Preparat 1			
1	10	1	11
2	5	0	5
3	6	0	6
4	7	0	7
5	6	0	6
6	8	1	9
7	5	0	5
8	6	0	6
9	4	1	5
10	4	3	7
11	8	0	8
12	13	0	13
13	9	0	9
14	6	0	6
15	8	0	8
16	5	1	6
17	3	3	6
18	1	2	3

19	1	2	3
20	4	0	4
21	6	1	7
22	4	0	4
23	7	0	7
24	11	0	11
25	9	1	10
26	5	1	6
27	10	1	11
28	6	0	6
29	6	1	7
30	10	0	10
31	5	0	5
32	13	0	13
33	9	0	9
34	7	0	7
35	9	0	9
36	7	0	7
37	8	2	10
38	11	0	11
39	14	0	14
40	10	0	10
41	9	1	10
Suma [szt]	295	22	317
Żywotność pyłku [%]	93,06		
Preparat 2			
1	35	3	38
2	4	1	5
3	4	0	4
4	3	2	5
5	4	0	4
6	4	1	5
7	6	0	6

8	6	0	6
9	3	1	4
10	5	1	6
11	6	2	8
12	36	2	38
13	26	5	31
14	21	1	22
15	20	1	21
16	10	0	10
17	9	0	9
18	8	0	8
19	10	1	11
20	9	0	9
21	12	0	12
22	9	1	10
23	8	0	8
24	6	1	7
25	12	0	12
26	6	1	7
27	5	0	5
28	4	0	4
29	9	1	10
30	5	0	5
Suma [szt]	305	25	330
Żywotność pyłku [%]		92,42	
Średnia żywotność pyłku [%]		92,74	

Tab. 4.15. Wyniki badania żywotności pyłku z wykorzystaniem acetokarminu.

Indeks badanego pola widzenia	Ilość żywych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość martwych ziaren pyłku w polu widzenia [szt]	Ilość ziaren pyłku w polu widzenia [szt]
Preparat 1			
1	12	1	13
2	9	2	11
3	8	1	9
4	11	0	11
5	8	1	9
6	9	0	9
7	7	0	7
8	7	1	8
9	7	0	7
10	9	0	9
11	9	0	9
12	6	1	7
13	8	0	8
14	10	0	10
15	12	0	12
16	10	0	10
17	8	0	8
18	7	0	7
19	8	1	9
20	10	1	11
21	11	0	11
22	7	0	7
23	8	0	8
24	9	0	9
25	9	2	11
26	13	0	13
27	11	0	11
28	11	0	11
29	8	0	8

30	10	1	11
31	10	0	10
32	10	1	11
33	4	1	5
34	6	0	6
Suma [szt]	302	14	316
Żywotność pyłku [%]		95,57	

Preparat 2

1	5	0	5
2	6	0	6
3	8	0	8
4	7	1	8
5	7	0	7
6	5	0	5
7	7	0	7
8	4	0	4
9	6	0	6
10	5	0	5
11	9	0	9
12	6	0	6
13	7	0	7
14	4	0	4
15	9	0	9
16	10	0	10
17	3	1	4
18	7	0	7
19	7	0	7
20	4	0	4
21	5	0	5
22	7	0	7
23	6	0	6
24	7	0	7
25	5	0	5

26	6	0	6
27	7	0	7
28	6	0	6
29	5	0	5
30	5	0	5
31	6	0	6
32	6	1	7
33	7	0	7
34	4	0	4
35	8	0	8
36	5	0	5
37	5	0	5
38	7	0	7
39	7	0	7
30	7	0	7
41	8	1	9
42	8	0	8
43	9	0	9
44	11	0	11
45	11	1	12
46	8	0	8
47	7	0	7
48	6	0	6
Suma [szt]	315	5	320
Żywotność pyłku [%]		98,44	
Średnia żywotność pyłku [%]		97,01	

5. WNIOSKI

Przeprowadzone doświadczenia w dla śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

- dla materiału pochodzącego z środowiska naturalnego zakażenia są poważnym problemem, 51,33% wyłożonych eksplantatów uległa zakażeniom podczas I etapu mikrorozmnażania – rozdziały 4.1.3 oraz 4.1.1. Skutecznymi metodami ograniczającymi ilość oraz skutki zakażeń są:
 - dodatek antybiotyku (cetofaksym w ilości 25 [ml/l]) w pożywce: spadek liczby zakażeń dla eksplantatów pochodzących od liścia o 43,93%, łuski spichrzowej o 46,11% oraz piętki 27,18% – rozdział 4.1.4,
 - dla eksplantatów łuskowych, wypreparowanie łusek z cebul przed odkażaniem: spadek liczby zakażeń o 20,00% – rozdział 4.1.5,
 - stosowanie kultur ratunkowych: 34,21% wszystkich otrzymanych regeneratów pochodziło właśnie z kultur ratunkowych – rozdział 4.1.6,
- zastosowana w I etapie pożywka – rozdział 3.1.2.1 jest efektywna jedynie dla eksplantatów pochodzących od piętki:
 - regenerację podjęło 54,00% eksplantatów pochodzących z piętki i 1,33% eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej. Żaden z eksplantatów liściowych nie podjął regeneracji – rozdział 4.2.5, oraz 4.2.1,
 - większość, 60,79% regeneratów na eksplantatach piętowych pojawiła się w pierwszych dwóch tygodniach po założeniu kultury. 40,74% w pierwszym i 27,16% w drugim tygodniu – rozdział 4.2.5,
 - rzeczywista efektywność regeneracyjna dla eksplantatów piętowych wyniosła 0,80 a potencjalna 2,22 – rozdział 4.2.6,
 - dominującym kierunkiem regeneracji była organogeneza pędowa (kaulogeneza) – 95,61% eksplantatów które podjęły regenerację, podjęły ją właśnie w tym kierunku. Rozdział 4.2.3,
- zastosowana pożywka oraz warunki prowadzenia kultury dla III etapie mikrorozmnażania wymagają dopracowania. Rozwój eksplantatów po 29 tygodniach był bardzo słaby – rozdział 4.4,
- pyłek wykazuje bardzo dużą żywotność, 95,33%. Czynnik ten z pewnością nie wpływa negatywnie na liczebność gatunku – rozdział 4.5.

Przeprowadzone doświadczenia w dla szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris* L. pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

- dla materiału pochodzącego z środowiska naturalnego zakażenia są poważnym problemem, 32,40% wyłożonych eksplantatów uległa zakażeniom podczas I etapu mikrorozmnażania – rozdziały 4.1.3 oraz 4.1.2. Skuteczną metodą ograniczającą ilość zakażeń jest:
 - dodatek antybiotyku (cetofaksym w ilości 25 [ml/l]) w pożywce: spadek liczby zakażeń dla eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej o 15,44% – rozdział 4.1.4,
- zastosowana w I etapie pożywka – rozdział 3.2.2.1 jest efektywna jedynie dla eksplantatów pochodzących od łuski spichrzowej oraz piętki:
 - regenerację podjęło 32,00% eksplantatów pochodzących z piętki oraz 44,00% eksplantatów pochodzących z łuski spichrzowej. Żaden z eksplantatów pochodzących z liścia, łodygi czy działki okwiatu nie podjął regeneracji – rozdział 4.2.5, oraz 4.2.2,
 - większość, 61,82% regeneratów na eksplantatach łuskowych pojawiła się w V i VI tygodniu po założeniu kultury. W przypadku eksplantatów piętkowych, większość 62,50% regeneratów pojawiła się w II tygodniu po założeniu kultury – rozdział 4.2.5,
 - rzeczywista efektywność regeneracyjna dla eksplantatów łuskowych wyniosła 1,53 a potencjalna 2,25, dla eksplantatów piętkowych kolejno 0,80 oraz 2,22 – rozdział 4.2.6,
 - jedynym kierunkiem regeneracji była organogeneza pędowa (kaulogeneza) – 100,00% eksplantatów które podjęły regenerację, podjęły ja właśnie w tym kierunku. Rozdział 4.2.3,
- zastosowana pożywka oraz warunki prowadzenia kultury dla III etapie mikrorozmnażania wymagają dopracowania. Rozwój eksplantatów po 24-25 tygodniach był bardzo słaby – rozdział 4.4,
- kiełkowanie nasion w temperaturze 22°C nie zachodzi. Konieczne jest działanie niższej temperatury przez dłuższy czas – rozdział 4.3,
- pyłek wykazuje bardzo dużą żywotność, 97,01%. Czynnik ten z pewnością nie wpływa negatywnie na liczebność gatunku – rozdział 4.6.

6.BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Kreiner, Słownik etymologiczny łacińskich nazw i terminów używanych w biologii i medycynie, Wrocław: Zakład Narodowy im. Ossolińskich - Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, 1963.
- [2] Royal Botanic Gardens, „The Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanical Garden,” [Online]. Available: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-310253>. [Data uzyskania dostępu: 13 11 2019].
- [3] The Royal Botanic Gardens, Kew, „World Checklist of Selected Plant Families (WCSP),” [Online]. Available:
https://wcsp.science.kew.org/synonomy.do?name_id=310253. [Data uzyskania dostępu: 13 11 2019].
- [4] The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria, The Australian National Herbarium, „International Plant Names Index (IPNI),” [Online]. Available: <https://www.ipni.org/n/60457991-2>. [Data uzyskania dostępu: 13 11 2019].
- [5] Pinterest Europe Ltd, „<https://pl.pinterest.com>,” [Online]. Available: <https://pl.pinterest.com>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [6] M. Jerzy i A. Krzymińska, Rozmnażanie wegetatywne roślin ozdobnych, Poznań: PWRiL, 2011.
- [7] M. Dallwitz, T. Paine, E. Zurcher i L. Watson, „DELTA – DEscription Language for TAxonomy,” [Online]. Available: <http://www.delta-intkey.com>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [8] H. Piękoś-Mirkowa i Z. Mirek, Flora Polski. Atlas roślin chronionych, Warszawa: MULTICO, 2003.
- [9] Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, „geoserwis mapy,” [Online]. Available: <http://geoserwis.gdos.gov.pl/mapy/>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [10] Flickr, „flickr,” [Online]. Available: <https://www.flickr.com/>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [11] Wikimedia Foundation, „Wikipedia The Free Encyclopedia,” [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [12] „Internetowy System Aktów Prawnych (ISAP),” [Online]. Available: <http://prawo.sejm.gov.pl/>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2109].
- [13] Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, „Centralny Rejestr Form Ochrony Przyrody,” [Online]. Available: <http://crfop.gdos.gov.pl>. [Data uzyskania dostępu: 16 styczeń 2019].
- [14] K. Górska, M. Kaszuba, S. Ligman, W. Pluskota, J. Wojciechowicz, A. Źróbek-Sokolnik i D. Michalczyk, „Wykłady i ćwiczenia z roślinnych kultur in-vitro,”

- [Online]. Available: <http://www.wbp.olsztyn.pl/~krist/skrypt/start.php>. [Data uzyskania dostępu: 16 Styczeń 2019].
- [15] A. Mikuła, D. Makowski, K. Tomiczak i J. Rybczyński, „Kultury in-vitro i krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów,” Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej, Powsin, 2013.
- [16] E. F. George, M. A. Hall i G.-J. De Klerk, Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition : Volume 1. The Background, Dordrecht: Springer, 2008.
- [17] N. Zagorska, M. Stanilova, V. Ilcheva i P. Gadeva, „Micropropagation of *Leucojum aestivum* L. (Summer Snowflake),” Springer, Sofia, Bulgaria, 1997.
- [18] Y. Bajaj, Biotechnology in Agriculture and Forestry 40. Hihg-Tech nad Micropropagation VI, New York: Springer, 1997.
- [19] A. Ptak, „*Leucojum aestivum* L. in vitro bulbs induction and acclimatization,” Central European Journal of Biology, Kraków, 2014.
- [20] M. Petrić, S. Jevremović, M. Trifunović, V. Tadić, S. Milosević i A. Subotić, Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of *Fritillaria meleagris* in bulb scale culture, Belgrade: University of Belgrade, 2014.
- [21] D. S. Muraseva, T. I. Novikova i A. A. Erst, Propagation and Conservation of Rare Species *Fritillaria meleagris* L. from Floral Explants, Nowosybirsk: Rosyjska Akademia Nauk, 2015.
- [22] M. Nikolić, D. Mišić, V. Maksimović, S. Jevremović, M. Trifunović i A. Subotić, Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture in vitro, Belgrad: Instytut "Siniša Stanković", 2008.
- [23] „Duchefa Biochemie,” [Online]. Available: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222>. [Data uzyskania dostępu: 15 12 2019].
- [24] „Szkoła Podstawowa w Siedliskach,” [Online]. Available: http://sp.siedliska.superszkolna.pl/wiadomosci/1/wiadomosc/68151/rajd_do_rezerwatu_przyrody_szachownica_w_krownikach. [Data uzyskania dostępu: 12 styczeń 2020].
- [25] P. B. Society, „Pacific Bulb Society,” [Online]. Available: <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/FritillariaGermination>. [Data uzyskania dostępu: 18 luty 2020].
- [26] E. Pojnar, W. Jaros i T. Kobyłko, Botanika teoria i ćwiczenia część II systematyka roślin, Kraków: Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Krakowie, 1999.
- [27] L. Rutkowski, Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej, Warszawa: PWN, 2015.
- [28] R. Kaźmierczakowa, K. Zarzycki i Z. Mirek, Polska Czerwona Księga Roślin, Kraków: Instytut ochrony przyrody PAN, 2014.

[29] R. Kaźmierczakowa, Polska Czerwona Lista paproników i roślin kwiatowych,
Kraków: Instytut Ochrony Przyrody PAN, 2016.

7. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1 Zezwolenie na pobranie roślin ze środowiska naturalnego.



**REGIONALNY DYREKTOR
OCHRONY ŚRODOWISKA
W RZESZOWIE**
al. Józefa Piłsudskiego 38
35-001 Rzeszów
WPN.6400.2.2018.AKw.2

Rzeszów, dnia 09 lutego 2018 r.

Decyzja

Działając na podstawie art. 104 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2017 r., poz. 1257, z późn. zm.), w związku z art. 51 ust. 1 pkt 6 i 7 w związku z art. 56 ust. 4 pkt 4 oraz art. 15 ust. 1 pkt 5, 15 i 24 w związku z art. 15 ust. 5 ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody (Dz. U. z 2018 r., poz. 142 z późn. zm.) oraz w związku z § 1 pkt 1 lit. a, b, § 2, § 3 oraz § 6 ust. 1 pkt 4 i 5 rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. z 2014 r., poz. 1409), po rozpatrzeniu wniosku Pana Rafała Kobaka – studenta Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, na odstępstwo od zakazów w stosunku do gatunków chronionych roślin tj.: śnieżycy wiosennej *Leucoium vernum* i szachownicy kostkowatej *Fritillaria meleagris*, oraz na odstępstwo od zakazów na terenie rezerwatów przyrody „Śnieżycy wiosenna w Dwerniczku” i „Szachownica w Krównikach”,

o r z e k a m

zezwalam Panu Rafałowi Kobak na odstępstwa od zakazów obowiązujących:

1. w stosunku do gatunków roślin chronionych: śnieżycy wiosenna *Leucoium vernum* i szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris*:
 - 1) pozyskiwania lub zbioru;
 - 2) przetrzymywania lub posiadania okazów gatunków;
2. na terenie rezerwatów przyrody „Śnieżycy wiosenna w Dwerniczku” i „Szachownica w Krównikach”:
 - 1) pozyskiwania, niszczenia lub umyślnego uszkadzania roślin;
 - 2) ruchu pieszego poza szlakami wyznaczonymi przez regionalnego dyrektora ochrony środowiska;
 - 3) prowadzenia badań naukowych;

w celu przeprowadzenia badań na temat opracowania optymalnych metod rozmnażania ginących gatunków roślin cebulowych techniką kultur in-vitro, które zostaną wykorzystane w pracy inżynierskiej Wnioskodawcy, pod następującymi warunkami:

1. Prace będą realizowane pod nadzorem Promotora przedmiotowej pracy inżynierskiej.
2. Zbiór wnioskowanych okazów odbywać się będzie ręcznie za pomocą łopatki.
3. Pobranych zostanie max. do 20 cebul szachownicy kostkowatej i max. do 20 cebul śnieżycy wiosennej.
4. Cebule zostaną zebrane przez Pana Rafała Kobaka jednorazowo, z różnych skupisk osobników tak, aby nie miało to negatywnego wpływu na lokalne populacje osobników.
5. Zebrane okazy będą przetrzymywane na Wydziale Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Niniejsza decyzja jest ważna do dnia 30 kwietnia 2018 r.

Regionalny Dyrektor Ochrony Środowiska w Rzeszowie nakłada na wnioskodawcę obowiązek przedłożenia sprawozdania z wykorzystania przedmiotowego zezwolenia w terminie do 31 maja 2018 r.

U z a s a d n i e n i e

Do Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Rzeszowie zwróciła się Pan Rafał Kobak student Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie z wnioskami z dnia 19 stycznia 2018 r. (data wpływu: 25 stycznia 2018 r.), na odstępstwo od zakazów w stosunku do gatunków chronionych roślin: śnieżycy wiosennej *Leucoium vernum* i

szachownicy kostkowej *Fritillaria meleagris*, oraz na odstępstwo od zakazów na terenie rezerwatów przyrody „Śnieżyca wiosenna w Dwerniczku” i „Szachownica w Krównikach”.

Celem wnioskowanych prac będzie zebranie materiału roślinnego w postaci cebul, które następnie zostaną przebadane pod kątem opracowania optymalnych metod rozmnażania ginących gatunków roślin cebulowych techniką kultur in-vitro. Badania wykorzystane zostaną w pracy inżynierskiej i postużyć mogą w przyszłości wykorzystaniu wypracowanych metod do szybkiego rozmnażania materiału danego gatunku w razie potrzeby np. nagiego zniszczenia stanowiska w naturze. Za wybraniem do badań wnioskowanych gatunków przemawia fakt, że oba gatunki są roślinami cebulowymi, które cechują się niskim współczynnikiem rozmnażania metodami tradycyjnymi.

Zgodnie z brzmieniem art. 15 ust. 5 w związku z art. 15 ust. 1 pkt 5, 15 i 24 ustawy o ochronie przyrody regionalny dyrektor ochrony środowiska może zezwolić na obszarze rezerwatu przyrody na odstępstwa od zakazów, jeżeli jest to uzasadnione wykonywaniem badań naukowych lub celami edukacyjnymi, kulturowymi, turystycznymi, rekreacyjnymi lub sportowymi lub celami kultu religijnego i nie spowoduje to negatywnego oddziaływanie na cele ochrony przyrody rezerwatu przyrody. Zgodnie z treścią wniosku przedmiotowe działania mają charakter badań naukowych.

Zgodnie z art. 56 ust. 2 pkt 1 oraz ust. 4 pkt 5 ustawy o ochronie przyrody, właściwy terytorialnie regionalny dyrektor ochrony środowiska może zezwolić na czynności polegające na zakazom określonym w art. 51 ust. 1 pkt 6 i 7 ww. ustawy, w przypadku braku rozwiązań alternatywnych, jeżeli nie są szkodliwe dla zachowania we właściwym stanie ochrony dziko występujących populacji chronionych gatunków roślin oraz są niezbędne do realizacji badań naukowych. Wnioskowane działania będą prowadzone w określonym zakresie zaś zebranie zostanie max. po 20 cebul wnioskowanych gatunków. W skali lokalnej populacji tych gatunków przyjmuje się, że wnioskowane prace nie będą miały istotnego wpływu.

Z uwagi na charakter wnioskowanych czynności nie będą one miały negatywnego oddziaływanie na obszar Natura 2000, na integralność tego obszaru oraz spójność sieci Natura 2000.

Uwzględniając właściwość rzeczową zgodnie z art. 19 i 20 Kodeksu postępowania administracyjnego orzec jak w sentencji decyzji.

Niniejsze zezwolenia podlega zwolnieniu z opłaty skarbowej na podstawie art. 2 ustawy z dnia 16 listopada 2006 r. o opłacie skarbowej.

Informacja o przedmiotowym wniosku została umieszczona w publicznie dostępnym wykazie danych o dokumentach zawierających informacje o środowisku i jego ochronie - karta nr 137/2018

P o u c z e n i e

Przedmiotowe zezwolenie nie jest tożsame z odstępstwem od zakazów w stosunku do gatunków chronionych innych niż wymieniony w niniejszym zezwoleniu, na które to wymagane jest odrębne zezwolenie, o którym mowa w art. 56 ust. 1 i 2.

Od niniejszej decyzji, na mocy art. 127 § 1 i 2 Kodeksu postępowania administracyjnego, służy stronie odwołanie do Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Warszawie za pośrednictwem Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Rzeszowie w terminie do 14 dni od daty jej doręczenia. Odwołanie należy wnieść w dwóch egzemplarzach bez uiszczenia opłaty skarbowej.

Zgodnie z treścią art. 130 § 4 Kodeksu postępowania administracyjnego, decyzja podlega wykonaniu przed upływem terminu do wniesienia odwołania, gdy jest zgodna z żądaniem wszystkich stron.

Otrzymuja:

Rafał Kobak, ul. Wojewicka 36/25, 54-438 Wrocław
Ad acta

Do wiadomości:

Nadleśnictwo Lutowiska, Lutowiska 4, 38-713

ZASTĘPCA REGIONALNEGO DYREKTORA
OCHRONY ŚRODOWISKA W RZESZOWIE


Radostaw Jędrak
Regionalny Konserwator Przyrody w Rzeszowie

Załącznik 2 Murashige & Skoog Medium Including Vitamins firmy „Duchefa Biochemie” – etykieta producenta.

M0222

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM INCLUDING VITAMINS

Original concentration, (1962)

Description	Composition	MSDS	Certificate of Analysis
Micro Elements			
CoCl ₂ .6H ₂ O		0.025	0.11
CuSO ₄ .5H ₂ O		0.025	0.10
FeNaEDTA		36.70	100.00
H ₃ BO ₃		6.20	100.27
KI		0.83	5.00
MnSO ₄ .H ₂ O		16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O		8.60	29.91
Macro Elements			
CaCl ₂		332.02	2.99
KH ₂ PO ₄		170.00	1.25
KNO ₃		1900.00	18.79
MgSO ₄		180.54	1.50
NH ₄ NO ₃		1650.00	20.61
Vitamins			
Glycine		2.00	26.64
myo-Inositol		100.00	554.94
Nicotinic acid		0.50	4.06

Vitamins	mg/l	µM
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	0.10	0.30

Total concentration Micro and Macro elements including vitamins: 4405.19 mg/l

Murashige T. and Skoog F., *Physiol. Plant.*, 15, 473 (1962).

Załącznik 3 Wykaz wszystkich założonych kultur dla gatunku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Data założenia	Pożywka	Rodzaj eksplantatu	Oznaczenie szalki	Liczba eksplantatów	Uwagi przy zakładaniu kultury
09.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-
09.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-
09.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-
09.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-
09.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/5	5	-
09.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/1	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/2	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-
09.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-
09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	5	-
09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	5	-
09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/3	5	-
09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/4	5	-

09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/5	5	-
09.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/6	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/4	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/5	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Liść etiolowany	ŚK/L/6	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/7	5	1 - wierzchołek liścia
16.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/8	5	5 - wierzchołek liścia
16.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/9	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/10	5	-
16.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/11	5	2 - wierzchołek liścia
16.03.2018	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/12	5	2 - wierzchołek liścia
16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/2	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/7	5	-

16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/8	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/9	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/10	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/11	5	-
16.03.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/12	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-
16.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-
16.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/4	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-
16.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/6	5	-
16.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/7	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/8	5	-
16.03.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/9	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/10	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/11	5	-
16.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/12	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-

23.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/5	5	5 - wierzchołek liścia
23.03.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	1,2,3,4,5 - łuski wypreparowane przed odkażaniem
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/2	5	1,2,3,4,5 - łuski wypreparowane przed odkażaniem
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/2	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/4	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-
23.03.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/6	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/1	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/2	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/3	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/5	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	1,2,3,4,5 - łuski wypreparowane przed odkażaniem

06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/2	5	1,2,3,4 - łuski wypreparowane przed odkażaniem, 5 - pączek
06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/3	5	5 - pączek
06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	5 - pączek
06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	5 - pączek
06.04.2018	MSSK2+CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/2	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/4	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/6	5	-
06.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/7	1	R. 1 szt z ŚK/P/9 16.03.18
16.04.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	3	R. 3 szt z ŚK/P/1 09.03.18
16.04.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	2	R. 2 szt z ŚK/P/6 16.03.18
16.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/3	3	R. 2 szt z ŚK/P/3 + 1 szt z ŚK/P/4 23.03.18
16.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/4	4	R. 2 szt z ŚK/P/3 + 1 szt z ŚK/P/6 + 1 szt z ŚK/P/9 16.03.18
20.04.2018	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/1	3	R. 2 szt z ŚK/Ł/3 + 1 szt z ŚK/Ł/5 06.04.18
20.04.2018	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	3	R. 2 szt z ŚK/P/4 + 1 szt z ŚK/P/3 16.04.18
20.04.2018	MSSK2+CF	Piętka	ŚK/P/2	4	R. 4 szt z ŚK/P/6 06.04.18

Załącznik 4 Wykaz regeneratów uzyskanych po etapie I oraz zakwalifikowanych do etapu III dla gatunku *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet

Data	Nazwa gatunkowa	Numer rośliny	Pożywka	Data zalożenia szalki źródłowej	Oznaczenie szalki źródłowej
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	1	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	2	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	3	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	4	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	5	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	6	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	7	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	8	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	9	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	10	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	11	MS	06.04.2018	ŚK/P/7
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	12	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	13	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	14	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	15	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	16	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	17	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	18	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	19	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	20	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	21	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	22	MS	06.04.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	23	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	24	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	25	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	26	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	27	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	28	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	29	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	30	MS	20.04.2018	ŚK/P/1

25.05.2018	Śnieżyca karpacka	31	MS	20.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	32	MS	09.03.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	33	MS	09.03.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	34	MS	09.03.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	35	MS	09.03.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	36	MS	16.03.2018	ŚK/Ł/10
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	37	MS	16.03.2018	ŚK/Ł/10
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	38	MS	16.03.2018	ŚK/Ł/10
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	39	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	40	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	41	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	42	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	43	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	44	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	45	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	46	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	47	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	48	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	49	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	50	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	51	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	52	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	53	MS	16.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	54	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	55	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	56	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	57	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	58	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	59	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	60	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	61	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	62	MS	23.03.2018	ŚK/P/4
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	63	MS	23.03.2018	ŚK/P/4

25.05.2018	Śnieżyca karpacka	64	MS	23.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	65	MS	23.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	66	MS	23.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	67	MS	23.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	68	MS	16.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	69	MS	16.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	70	MS	16.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	71	MS	16.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	72	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	73	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	74	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	75	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	76	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	77	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	78	MS	16.03.2018	ŚK/P/6
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	79	MS	23.03.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	80	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	81	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	82	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	83	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	84	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	85	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	86	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	87	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	88	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	89	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	90	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	91	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	92	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	93	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	94	MS	06.04.2018	ŚK/P/1
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	95	MS	16.03.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	96	MS	16.03.2018	ŚK/P/5

25.05.2018	Śnieżyca karpacka	97	MS	16.03.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	98	MS	16.03.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	99	MS	16.03.2018	ŚK/P/5
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	100	MS	06.04.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	101	MS	23.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	102	MS	23.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	103	MS	23.03.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	104	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	105	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	106	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	107	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	108	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	109	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	110	MS	06.04.2018	ŚK/P/2
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	111	MS	16.04.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	112	MS	16.04.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	113	MS	16.04.2018	ŚK/P/3
25.05.2018	Śnieżyca karpacka	114	MS	16.04.2018	ŚK/P/3

Załącznik 5 Wykaz wszystkich założonych kultur dla gatunku *Fritillaria meleagris* L.

Data założenia	Pożywka	Rodzaj eksplantatu	Oznaczenie szalki	Liczba eksplantatów	Uwagi przy zakładaniu
02.03.2018	MS	Nasiona	FM	4	
02.03.2018	MS	Nasiona	FM	4	
02.03.2018	MS	Nasiona	FM	4	
02.03.2018	MS	Nasiona	FM	4	
16.04.2018	MSSK	Płatki korony	FM/PŁ/1	5	
16.04.2018	MSSK	Płatki korony	FM/PŁ/2	5	
16.04.2018	MSSK	Płatki korony	FM/PŁ/3	5	
16.04.2018	MSSK	Płatki korony	FM/PŁ/4	5	
16.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/1	5	
16.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/2	5	
16.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/3	5	
16.04.2018	MSSK	Liść cięty wzdłuż	FM/L/1	5	
16.04.2018	MSSK	Liść cięty wzdłuż	FM/L/2	5	
16.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/3	5	
16.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/4	5	
16.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/5	5	

16.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/6	5	
16.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/7	5	
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/1	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/2	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/3	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/4	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/5	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/6	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
16.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/7	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie
27.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/1	5	
27.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/2	5	
27.04.2018	MSSK	Liść zielony	FM/L/3	5	
27.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/1	5	
27.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/2	5	
27.04.2018	MSSK	Łodyga	FM/ŁD/3	5	
27.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/1	5	
27.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/2	5	
27.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/3	5	
27.04.2018	MSSK	Piętka	FM/P/4	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/1	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/2	5	

27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/3	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/4	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/5	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/6	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/7	5	
27.04.2018	MSSK	Łuska	FM/Ł/8	5	
11.05.2018	MSSK+A	Piętka	FM/P/1	5	
11.05.2018	MSSK+A	Piętka	FM/P/2	5	
11.05.2018	MSSK+A	Piętka	FM/P/3	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/1	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/2	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/3	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/4	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/5	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/6	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/7	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/8	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/9	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/10	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/11	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/12	5	

11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/13	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/14	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/15	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/16	5	
11.05.2018	MSSK+A	Łuska	FM/Ł/17	5	

Załącznik 6 Wykaz regeneratów uzyskanych po etapie I oraz zakwalifikowanych do etapu III dla gatunku *Fritillaria meleagris* L.

Data	Nazwa gatunkowa	Numer rośliny	Pozywka	Data założenia szalki źródłowej	Oznaczenie szalki źródłowej
22.06.2018	Szachownica kostkowata	1	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	2	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	3	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	4	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	5	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	6	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	7	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	8	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	9	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	10	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	11	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	12	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	13	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	14	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	15	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	16	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	17	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	18	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	19	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	20	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	21	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	22	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	23	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	24	MS	11.05.2018	FM/Ł/16
22.06.2018	Szachownica kostkowata	25	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	26	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	27	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	28	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	29	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	30	MS	11.05.2018	FM/Ł/15

22.06.2018	Szachownica kostkowata	31	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	32	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	33	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	34	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	35	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	36	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	37	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	38	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	39	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	40	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	41	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	42	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	43	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	44	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	45	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	46	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	47	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	48	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	49	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	50	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	51	MS	11.05.2018	FM/Ł/15
22.06.2018	Szachownica kostkowata	52	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	53	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	54	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	55	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	56	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	57	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	58	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	59	MS	11.05.2018	FM/Ł/11
22.06.2018	Szachownica kostkowata	60	MS	27.04.2018	FM/Ł/2
22.06.2018	Szachownica kostkowata	61	MS	27.04.2018	FM/Ł/2
22.06.2018	Szachownica kostkowata	62	MS	27.04.2018	FM/Ł/2
22.06.2018	Szachownica kostkowata	63	MS	27.04.2018	FM/Ł/2

22.06.2018	Szachownica kostkowata	97	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	98	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	99	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	100	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	101	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	102	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	103	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	104	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	105	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	106	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	107	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	108	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	109	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	110	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	111	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	112	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	113	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	114	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	115	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	116	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	117	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	118	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	119	MS	27.04.2018	FM/Ł/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	120	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	121	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	122	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	123	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	124	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	125	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	126	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	127	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	128	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	129	MS	16.04.2018	FM/P/3

22.06.2018	Szachownica kostkowata	130	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	131	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	132	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	133	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	134	MS	16.04.2018	FM/P/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	135	MS	27.04.2018	FM/Ł/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	136	MS	27.04.2018	FM/Ł/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	137	MS	27.04.2018	FM/Ł/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	138	MS	27.04.2018	FM/Ł/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	139	MS	27.04.2018	FM/Ł/3
22.06.2018	Szachownica kostkowata	140	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	141	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	142	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	143	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	144	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	145	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	146	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	147	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	148	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	149	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	150	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	151	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	152	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	153	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	154	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	155	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	156	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	157	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	158	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	159	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	160	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	161	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	162	MS	16.04.2018	FM/P/1

22.06.2018	Szachownica kostkowata	163	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	164	MS	16.04.2018	FM/P/1
22.06.2018	Szachownica kostkowata	165	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	166	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	167	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	168	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	169	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	170	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	171	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	172	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	173	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	174	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
22.06.2018	Szachownica kostkowata	175	MS	27.04.2018	FM/Ł/7
29.06.2018	Szachownica kostkowata	176	MS	11.05.2018	FM/Ł/5
29.06.2018	Szachownica kostkowata	177	MS	11.05.2018	FM/Ł/5
29.06.2018	Szachownica kostkowata	178	MS	11.05.2018	FM/Ł/5
29.06.2018	Szachownica kostkowata	179	MS	11.05.2018	FM/Ł/5
29.06.2018	Szachownica kostkowata	180	MS	11.05.2018	FM/Ł/5
29.06.2018	Szachownica kostkowata	181	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	182	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	183	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	184	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	185	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	186	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	187	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	188	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	189	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	190	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	191	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	192	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	193	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	194	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	195	MS	11.05.2018	FM/Ł/8

29.06.2018	Szachownica kostkowata	196	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	197	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	198	MS	11.05.2018	FM/Ł/8
29.06.2018	Szachownica kostkowata	199	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	200	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	201	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	202	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	203	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	204	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	205	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	206	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	207	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	208	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	209	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	210	MS	11.05.2018	FM/Ł/2
29.06.2018	Szachownica kostkowata	211	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	212	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	213	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	214	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	215	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	216	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	217	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	218	MS	11.05.2018	FM/Ł/3
29.06.2018	Szachownica kostkowata	219	MS	11.05.2018	FM/Ł/14
29.06.2018	Szachownica kostkowata	220	MS	11.05.2018	FM/Ł/17
29.06.2018	Szachownica kostkowata	221	MS	11.05.2018	FM/Ł/17
29.06.2018	Szachownica kostkowata	222	MS	11.05.2018	FM/Ł/17
29.06.2018	Szachownica kostkowata	223	MS	11.05.2018	FM/Ł/17
29.06.2018	Szachownica kostkowata	224	MS	11.05.2018	FM/Ł/9
29.06.2018	Szachownica kostkowata	225	MS	11.05.2018	FM/Ł/9
29.06.2018	Szachownica kostkowata	226	MS	11.05.2018	FM/Ł/4
29.06.2018	Szachownica kostkowata	227	MS	11.05.2018	FM/Ł/4
29.06.2018	Szachownica kostkowata	228	MS	11.05.2018	FM/Ł/4

29.06.2018	Szachownica kostkowata	229	MS	11.05.2018	FM/Ł/1
29.06.2018	Szachownica kostkowata	230	MS	11.05.2018	FM/Ł/1
29.06.2018	Szachownica kostkowata	231	MS	11.05.2018	FM/Ł/1

Załącznik 7 Zakażenia w kulturach I etapu mikrorozmnażania dla *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sweet.

Data zalożenia	Nazwa gatunkowa	Pożywka	Rodzaj eksplanta tu	Oznaczenie szalki	Liczba eksplantatów	Uwagi przy zakładaniu	Obserwacja 16.03.2018	Obserwacja 23.03.2018	Obserwacja 06.04.2018	Obserwacja 16.04.2018	Obserwacja 20.04.2018	Obserwacja 27.04.2018	Obserwacja 11.05.2018	Ilość eksplantatów bez zakażeń
Liść														
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-	brak	1,4	x	x	x	x	x	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-	2	2,3	x	x	x	x	x	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-	1,3,5	1,3,5	x	x	x	x	x	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-	5	1,5	x	x	x	x	x	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/5	5	-	brak	brak	brak	4	4	4	4	4
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-	brak	5						
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-	nd	brak	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-	nd	4,5	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-	nd	5	x	x	x	x	x	0

16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/4	5	-	nd	1,3	x	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść etiolowany	ŚK/L/5	5	-	nd	1	x	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść etiolowany	ŚK/L/6	5	-	nd	brak	3	3	3,5	3,5	3,4,5	2	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/7	5	1 - wierzchołek liścia	nd	5	x	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/8	5	5 - wierzchołek liścia	nd	3	brak	brak	brak	brak	brak	5	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/9	5	-	nd	brak	1	1	1	1,4	1,4	3	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/10	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/11	5	2 - wierzchołek liścia	nd	brak	brak	brak	4	4	4	4	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Liść zielony	ŚK/L/12	5	2 - wierzchołek liścia	nd	4	x	x	x	x	x	0	
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść etiolowany	ŚK/L/1	5	-	nd	nd	brak	1,5	1,5	1,5	1,3,5	2	
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść etiolowany	ŚK/L/2	5	-	nd	nd	4	4	4	2,4	2,4	3	

23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść etiolowany	ŚK/L/3	5	-	nd	nd	x	x	x	x	x	x	0
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-	nd	nd	brak	brak	brak	brak	3	4	
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/5	5	5 - wierzchołek liścia	nd	nd	brak	brak	brak	brak	1	4	
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-	nd	nd	brak	brak	2	2	2	4	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/1	5	-	nd	nd	nd	2	2	2	1,2,3	2	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/2	5	-	nd	nd	nd	2	2	2	2,3	3	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/3	5	-	nd	nd	nd	2	2	2	1,5	3	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/4	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	brak	3,4	3	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/5	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	brak	1	4	
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Liść zielony	ŚK/L/6	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	brak	1,3	3	
SUMA														63	
Łuska															
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/1	5	-	5	3,4,5	x	x	x	x	x	0	
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/2	5	-	1	1	x	x	x	x	x	0	
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-	1,3	1,3,4	x	x	x	x	x	0	
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-	4	4,5	x	x	x	x	x	0	

09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-	1	1	x	x	x	x	x	x	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-	5	5	x	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	3	4	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/2	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	3	4	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-	nd	2,3,4	2,3,4	2,3,4	2,3,4	2,3,4	2,3,4	2	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-	nd	brak	brak	4	4	4	4	4	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-	nd	brak	brak	1	1	1,2,3,5	1,2,3,5	1	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	4	4	4	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/7	5	-	nd	brak	x	x	x	x	x	0	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/8	5	-	nd	brak	brak	2	2	2,3,5	2,3,5	2	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/9	5	-	nd	4	brak	4	4	4	3,4	3	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/10	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/11	5	-	nd	1,2,3,4	x	x	x	x	x	0	
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/12	5	-	nd	1,2,3,4	x	x	x	x	x	0	
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	1,2,3,4,5 - łuski wypreparowane przed	nd	nd	3	3,5	3,5	3,5	3,5	3	

						odkażanie m								
23.03. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/2	5	1,2,3,4,5 - łuski wyprepar owane przed odkażanie m	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
23.03. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/3	5	-	nd	nd	brak	1	1	1	1,5	3
23.03. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	-	nd	nd	x	x	x	x	x	0
23.03. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	-	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
23.03. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-	nd	nd	brak	1	1	1	1	4
06.04. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/1	5	1,2,3,4,5 - łuski wyprepar owane przed odkażanie m	nd	nd	nd	brak	brak	4	4	4
06.04. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/2	5	1,2,3,4 - łuski wyprepar owane przed odkażanie m, 5 - pączek	nd	nd	nd	brak	brak	brak	2	4

06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/3	5	5 - pączek	nd	nd	nd	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3,4	+
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/4	5	5 - pączek	nd	nd	nd	4	4	4	4	4
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/5	5	5 - pączek	nd	nd	nd	3,4	3,4	3,4	3,4,5	2
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Łuska	ŚK/Ł/6	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	5	1,5	3
20.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Łuska	ŚK/Ł/1	3	R. 2 szt z ŚK/Ł/3 + 1 szt z ŚK/Ł/5 06.04.18	nd	nd	nd	nd	1,2,3	1,2,3	2	
SUMA													69	

Piętka

09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	5	-	brak	brak	brak	2	2	2	2	4
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	5	-	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/3	5	-	brak	1,4	1,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/4	5	-	5	brak	brak	brak	4	1,4	1,2,4,5	1
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/5	5	-	1,2	1,2	1,2	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4,5	0
09.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/6	5	-	2,4	2,4	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	5	-	nd	3,4	x	x	x	x	x	0

16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-	nd	1,4	1,4	1,4	4	4	4,3	3
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/4	5	-	nd	3,4	3,4,5	1,3,4,5	1,3,4,5	1,3,4,5	1,2,3,4,5	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	1,3	3
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/6	5	-	nd	brak	brak	1,2	1,2	1,2	1,2	3
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/7	5	-	nd	3	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/8	5	-	nd	brak	brak	brak	brak	brak	2	4
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/9	5	-	nd	2,4	2,4	2,4	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/10	5	-	nd	brak	2	2	2	2,3	1,2,3,4,5	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/11	5	-	nd	1,2	x	x	x	x	x	0
16.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/12	5	-	nd	1,4	x	x	x	x	x	0
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-	nd	nd	x	x	x	x	x	0
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/2	5	-	nd	nd	brak	brak	brak	brak	4	4
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-	nd	nd	brak	1	1	1	1,3	3
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/4	5	-	nd	nd	brak	brak	3	3	3	4
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-	nd	nd	brak	brak	4	4	2,4	3
23.03.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/6	5	-	nd	nd	brak	brak	3	3	3	4

06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/1	5	-	nd	nd	nd	brak	3	3	3	4
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/2	5	-	nd	nd	nd	2,4	2,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/3	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	brak	2,3,4	2
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/4	5	-	nd	nd	nd	brak	4	4	2,3,4,5	1
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/5	5	-	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	5
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/6	5	-	nd	nd	nd	4	4	4	1	4
06.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/7	1	R. 1 szt z ŚK/P/9 16.03.18	nd	nd	nd	brak	brak	brak	1	4
16.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	3	R. 3 szt z ŚK/P/1 09.03.18	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	5
16.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/2	2	R. 2 szt z ŚK/P/6 16.03.18	nd	nd	nd	1	1	1	1	4
16.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/3	3	R. 2 szt z ŚK/P/3 + 1 szt z ŚK/P/4 23.03.18	nd	nd	nd	2,3	2,3	2,3	2,3	3
16.04.2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/4	4	R. 2 szt. z ŚK/P/3 + 1 szt. z ŚK/P/6 + 1 szt. z ŚK/P/9 16.03.18	nd	nd	nd	1,2	1,2	1,2	1,2	3

20.04. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2	Piętka	ŚK/P/1	3	R. 2 szt z ŚK/P/4 + 1 szt z ŚK/P/3 16.04.18	nd	nd	nd	nd	nd	brak	1	4
20.04. 2018	Śnieżyca karpacka	MSSK2 +CF	Piętka	ŚK/P/2	4	R. 4 szt z ŚK/P/6 06.04.18	nd	nd	nd	nd	nd	1,2,3,4	x	0
SUMA														87

Załącznik 8 Zakażenia w kulturach I etapu mikrorozmnażania dla *Fritillaria meleagris* L.

Data założenia	Nazwa gatunkowa	Pozywka	Rodzaj eksplantatu	Oznaczenie eksplana szalki	Liczba eksplantów	Uwagi przy zakładaniu	Obserwacja 16.03.2018	Obserwacja 23.03.2018	Obserwacja 06.04.2018	Obserwacja 16.04.2018	Obserwacja 20.04.2018	Obserwacja 27.04.2018	Obserwacja 11.05.2018	Obserwacja 25.05.2018	Obserwacja 22.06.2018	Ilość eksplantów bez zakażeń	
Liść																	
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść cięty wzdłuż	FM/L/1	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść cięty wzdłuż	FM/L/2	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść zielony	FM/L/3	5		nd	nd	nd	nd	brak	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść zielony	FM/L/4	5		nd	nd	nd	nd	brak	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść zielony	FM/L/5	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04.2018	Szachownica kostkowata	MSS K	Liść zielony	FM/L/6	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	brak	5

16.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Liść zielony	FM/L/7	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Liść zielony	FM/L/1	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	5
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Liść zielony	FM/L/2	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	1	1	4
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Liść zielony	FM/L/3	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	5
SUMA															45	
Łodyga nadziemna																
16.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łodyga	FM/ŁD/1	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy horyzontalnie	nd	nd	nd	nd	brak	2	2	2	2	4
16.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łodyga	FM/ŁD/2	5	dwa eksplantaty wertykalnie i trzy	nd	nd	nd	nd	1,4,5	1,4,5	1,4,5	1,4,5	1,4,5	2

							horyzon talnie										
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/3	5		dwa eksplant aty wertyka lnie i trzy horyzon talnie	nd	nd	nd	nd	3,5	2,3,5	2,3,5	2,3,5	2,3,5	2
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/4	5		dwa eksplant aty wertyka lnie i trzy horyzon talnie	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/5	5		dwa eksplant aty wertyka lnie i trzy horyzon talnie	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/6	5		dwa eksplant aty wertyka lnie i trzy	nd	nd	nd	nd	brak	1,4	1,4	1,4	1,4	3

							horyzon talnie										
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/7	5	dwa eksplant aty wertyka lnie i trzy horyzon talnie	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5	
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/1	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	5	
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/2	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,3,5	1,3,5	1,3,5	2	
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łodyg a	FM/Ł D/3	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	4	4	4	4	
SUMA																37	
Łuska																	
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 1	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	5	
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 2	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	5	

27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 3	5		nd	brak	brak	brak	5						
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 4	5		nd	1	x	x	0						
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 5	5		nd	1,2,3,4, 5	x	x	0						
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 6	5		nd	brak	brak	brak	5						
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 7	5		nd	brak	3,4	3,4	3						
27.04. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K	Łuska	FM/Ł/ 8	5		nd	2,3,4,5	x	x	0						
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 1	5		nd	1,3,5	1,3,5	2							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 2	5		nd	brak	brak	5							

11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 3	5		nd	brak	brak	5							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 4	5		nd	2	2	4							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 5	5		nd	5	5	4							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 6	5		nd	1,4,5	1,4,5	2							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 7	5		nd	1,2,3,4, 5	1,2,3,4, 5	0							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 8	5		nd	brak	brak	5							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 9	5		nd	1,3,5	1,3,5	2							
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 10	5		nd	1,4,5	1,4,5	2							

11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 11	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	5
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 12	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	5
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 13	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	1,2	3
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 14	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,5	3,5	3
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 15	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	5
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 16	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	5
11.05. 2018	Szachownica kostkowa	MSS K+A	Łuska	FM/Ł/ 17	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	brak	brak	5
SUMA																85	
Piątka																	
16.04. 2018	Szachownica	MSS K	Piątka	FM/P/ 1	5		nd	nd	nd	nd	nd	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	3

	kostko wata															
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 2	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	1,2,3	2
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 3	5		nd	nd	nd	nd	3,5	3,5	3,5	brak	brak	5
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 1	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,2,3,4, 5	x	x	0
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 2	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	5	5	5	4
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 3	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,2,3,4, 5	x	x	0
27.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Piętka	FM/P/ 4	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	1	1	4
11.05. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K+A	Piętka	FM/P/ 1	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	0
11.05. 2018	Szacho wnica	MSS K+A	Piętka	FM/P/ 2	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	0

	kostko wata															
11.05. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K+A	Piętka	FM/P/ 3	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	0
SUMA															18	
Działki okwiatu																
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Płatki korony	FM/PŁ /1	5		nd	nd	nd	nd	4	4	4	4	4	4
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Płatki korony	FM/PŁ /2	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Płatki korony	FM/PŁ /3	5		nd	nd	nd	nd	brak	brak	brak	brak	brak	5
16.04. 2018	Szacho wnica kostko wata	MSS K	Płatki korony	FM/PŁ /4	5		nd	nd	nd	nd	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4, 5	1,2,3,4, 5	1,2,3,4, 5	0
SUMA															14	