



Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

Kierunek studiów: Ogrodnictwo

Specjalność: Ogrodnictwo z marketingiem

Koło naukowe: Koło naukowe ogrodników, sekcja mykologiczna

Rafał Kobak

Nr albumu: 57053

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

Spis treści

1.	WSTĘP	4
2.	PRZEGLĄD LITERATURY	5
2.1.	Śnieżyca karpacka <i>Leucojum vernum</i> subsp. <i>carpaticum</i> Sims.....	5
2.1.1.	Charakterystyka rodziny <i>Amaryllidaceae</i>	5
2.1.2.	Morfologia	6
2.1.3.	Biologia i siedlisko	9
2.1.4.	Występowanie	10
2.1.5.	Zagrożenia i ochrona	11
2.2.	Szachownica kostkowata <i>Fritillaria meleagris</i> L.....	12
2.2.1.	Charakterystyka rodziny <i>Amaryllidaceae</i>	12
2.2.2.	Morfologia	13
2.2.3.	Biologia i siedlisko	14
2.2.4.	Występowanie	14
2.2.5.	Zagrożenia i ochrona	14
3.	RODZAJE KULTUR IN-VITRO	16
4.	METODYKA BADAŃ	16
4.1.	Laboratorium	16
4.2.	Śnieżyca karpacka <i>Leucojum vernum</i> var. <i>carpaticum</i>	16
4.2.1.	Materiał wyjściowy	16
4.2.2.	Zastosowane pożywki	16
4.2.3.	Rodzaje eksplantatów	16
4.2.4.	Metody odkażania.....	16
4.2.5.	Czas prowadzenie kultur	16
4.3.	Szachownica kostkowata <i>Fritillaria meleagris</i>	16
4.3.1.	Materiał wyjściowy	16
4.3.2.	Zastosowane pożywki	16
4.3.3.	Rodzaje eksplantatów	16
4.3.4.	Metody odkażania.....	16
4.3.5.	Czas prowadzenie kultur	16
5.	PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA	16
5.1.	Śnieżyca karpacka.....	16
5.1.1.	Inicjacja kultur	16
5.1.2.	Rozwój eksplantatów.....	17
5.1.3.	Ilość uzyskanych mikrocebul	17

5.1.4.	Zakażenia w kulturach.....	17
5.2.	Szachownica kostkowata	17
5.2.1.	Inicjacja kultur	17
5.2.2.	Rozwój eksplantatów.....	17
5.2.3.	Ilość uzyskanych mikrocebulek	17
5.2.4.	Zakażenia w kulturach.....	17
6.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW	17
6.1.	Śnieżnica karpicka.....	17
6.2.	Szachownica kostkowata	17
6.3.	Porównanie obu gatunków	17
7.	WNIOSKI I MOŻLIWOŚCI ROZWOJU DOŚWIADCZENIA	17
8.	LITERATURA	19

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 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 – 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 karpackiej *Leucojum vernum* var. *carpathicum* Sims (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 użyta 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 płatek korony - 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 mikrocebul, 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. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. Śnieżycza karpacka *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims

Jedna z najwcześniej kwitnących na wiosnę roślin. Nazwa rodzaju *Leucojum* pochodzi od greckich słów *to leucon* i *ich* co znaczy biały fiołek. Śnieżycza karpacka ma obecnie status podgatunku śnieżycy wiosennej – *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims. W przeszłości była uważana za jej odmianę – *Leucojum vernum* var. *carpaticum* Sims, jak i samodzielny gatunek – *Leucojum carpathicum* (Sims) Sweet. Roślina w swoim naturalnym środowisku przedstawiona została na rys.2.1. Śnieżycza karpacka jest rośliną trującą ze względu na wysoką zawartość alkaloidów, głównie leukoiny oraz galantaminy.



Rys.2.1. Śnieżycza karpacka *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims.

2.1.1. Charakterystyka rodziny *Amaryllidaceae*

Śnieżycza karpacka jest przedstawicielem rodziny *Amaryllidaceae* (Amarylkowatych). Rośliny z tej rodziny są bylinami cebulowymi lub kłączowymi. Kwiaty występują pojedynczo lub zebrane są w pozorne baldachy. Symetria kwiatu jest promienista. Okwiat jest niezróżnicowany na kielich i koronę, podwójny i 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: $* P_{3+3} A_{3+3} \bar{G}_{(3)}$.

2.1.2. Morfologia

Schematyczna morfologia śnieżycy karpackiej została przedstawiona na rys.2.2. Wysokość przedstawicieli tego gatunku dochodzi do 30 cm.



Rys.2.2. Morfologia śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims.[x1]

Roślina posiada przekształcony pęd podziemny w postaci cebuli. Cebula tego gatunku jest w kształcie kulista, lekko wydłużona w górnej części, jej średnica w najszerszym miejscu wynosi około 3 cm. Jest to cebula wieloletnia, tunikowa, zamknięta. Cebula śnieżycy karpackiej w stanie spoczynku przedstawiona została na rys.2.3.



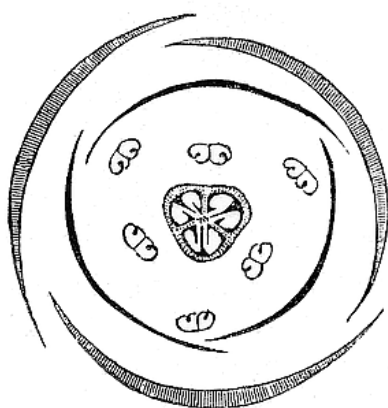
Rys.2.3. Cebula śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims. [1]

Liście zielone, odziomkowe w liczbie 3-4, równowąskie o szerokości około 4-13 mm, tępo zakończone. Łodyga wzniesiona, bezlistna, nierozgałęziona, 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.



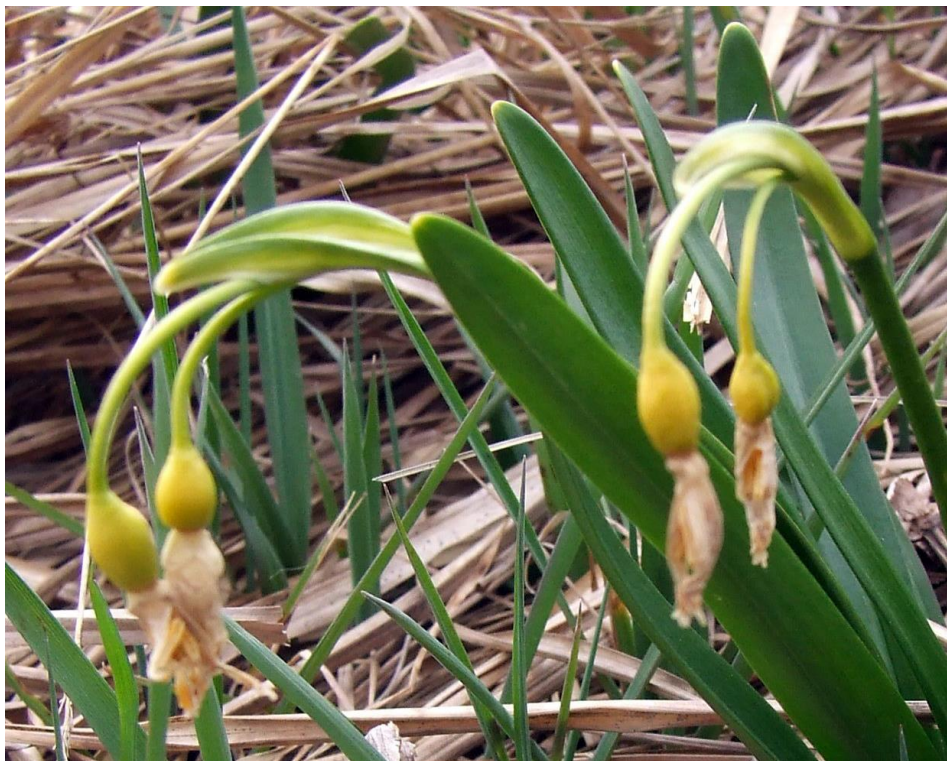
Rys.2.4. Pęd kwiatostanowy śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims.

Pojedynczy kwiat jest dzwonkowaty, zwieszony. Działki okwiatu zebrane w dwa okółki po trzy, każdy w kolorze białym z żółtą łezką 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 [x2] oraz kwiat śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims.

Owoce jest mięsista, okrągła torebka wypełniona nasionami. Niedojrzałe jeszcze owoce przedstawiono na rys.2.6.



Rys.2.6. Owoce śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims.

2.1.3. Biologia i siedlisko

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

Kwitnie w marcu i kwietniu. Roślina owadopylna, zapylenia dokonują głównie pszczoły. Nasiona są roznoszone głównie za pośrednictwem mrówek – 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 $2n = 22$.



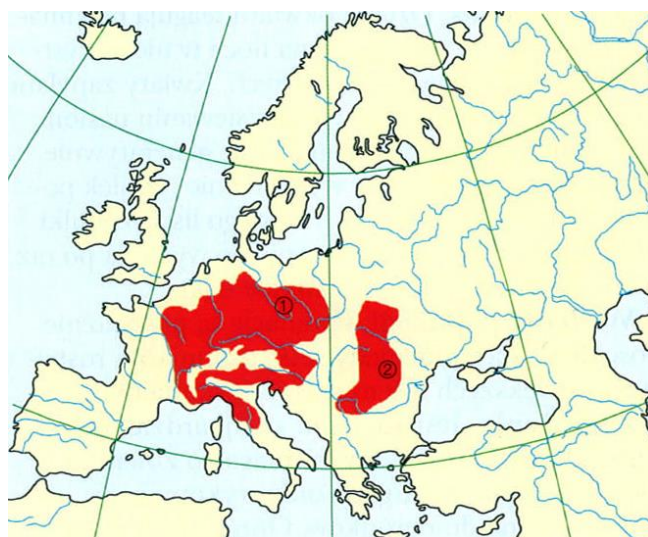
Rys.2.7. Populacja śnieżycy karpackiej *Leucojum vernum* subsp. *carpaticum* Sims w Dwerniczku.

Rośnie na wilgotnych i podmokłych łąkach i zaroślach. Wymaga gleb zasobnych, eutroficznych o odczynie od 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

Śnieżycza 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 śnieżycza karpacka *Leucojum vernum* subsp. *carpathicum* Sims, natomiast czerwona plama z numerem 1 odnosi się do występowania drugiego podgatunku śnieżycy wiosennej, podgatunku typowego – *Leucojum vernum* subsp. *vernum*.



Rys.2.8. Występowanie obu podgatunków śnieżycy wiosennej na świecie:
1 – podgatunek typowy, 2 – podgatunek karpacki. [2]

Na terenie naszego kraju 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 „Śnieżycza wiosenna w Dwerniczku” na terenie gminy Lutowiska w województwie podkarpackim.



Rys.2.9. Występowanie obu podgatunków śnieżycy wiosennej w Polsce:
1 – podgatunek typowy, 2 – podgatunek karpacki. [2]

2.1.5. Zagrożenia i ochrona

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

Przyczyną narażania 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”. [x3]

2.2. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris* L.

Jedna z pięknie kwitnących roślin w rodzimej florze. Nazwa rodzaju *Fritillaria* pochodzi z łaciny od słowa *fritillus* co oznacza kubek do gry w kości. Polska nazwa rodzajowa nawiązuje do charakterystycznego wzoru na działkach okwiatu. Roślina w stadium kwitnienia przedstawiona została na rys.2.11. Szachownica kostkowata jest rośliną trującą ze względu na zawartość alkaloidu, imperialiny.



Rys.2.11. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris* L. [x4]

2.2.1. Charakterystyka rodziny *Liliaceae*

Szachownica kostkowata jest przedstawicielem rodziny *Liliaceae* (Liliowatych). Rośliny z tej rodziny są bylinami cebulowymi lub kłączowymi. Kwiaty występują pojedynczo lub zebrane są w kwiatostany – grona lub wiechy. Symetria kwiatu jest promienista. Okwiat jest nieodróżniony na kielich i koronę, podwójny i 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: $* P_{3+3} A_{3+3} \bar{G}_{(3)}$.

2.2.2. Morfologia



Rys.2.12. Morfologia szachownicy kostkowanej *Fritillaria meleagris* L.[x1]



2.2.3. Biologia i siedlisko

2.2.4. Występowanie

2.2.5. Zagrożenia i ochrona



https://en.wikipedia.org/wiki/Fritillaria#/media/File:EB1911_Flower_-_diagram_of_Fritillaria_flower.jpg



3. RODZAJE KULTUR IN-VITRO

4. METODYKA BADAŃ

Na jaką metodę prowadzenia kultur zdecydował się, kultury stożków wzrostu w postaci pietki, pąki przybyszowe

4.1. Laboratorium

/autoklaw, użyte wysażenie (wagi, mieszadła etc.), pomieszczenia, komora do pracy, pomieszczenie wzrostowe/

4.2. Śnieżycza karpacka *Leucojum vernum* var. *carpaticum*

4.2.1. Materiał wyjściowy

4.2.2. Zastosowane pożywki

4.2.3. Rodzaje eksplantatów

4.2.4. Metody odkażania

4.2.5. Czas prowadzenie kultur

4.3. Szachownica kostkowata *Fritillaria meleagris*

4.3.1. Materiał wyjściowy

4.3.2. Zastosowane pożywki

4.3.3. Rodzaje eksplantatów

4.3.4. Metody odkażania

4.3.5. Czas prowadzenie kultur

5. PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

5.1. Śnieżycza karpacka

5.1.1. Inicjacja kultur

Kiedy i ile eksplantatów, zestawienia tabelaryczne, jakie pożywki, terminy, faza rośliny matecznej

5.1.2. Rozwój eksplantatów

Po jakim czasie co się działo z esplantatami, jaki procent na jakich pożywkach

5.1.3. Ilość uzyskanych mikrocebul

5.1.4. Zakażenia w kulturach

Po jakim czasie co się działo z esplantatami, jaki procent na jakich pożywkach

5.2. Szachownica kostkowata

5.2.1. Inicjacja kultur

Kiedy i ile esplantatów, zestawienia tabelaryczne, jakie pożywki, terminy, faza rosliny matecznej

5.2.2. Rozwój eksplantatów

Po jakim czasie co się działo z esplantatami, jaki procent na jakich pożywkach

5.2.3. Ilość uzyskanych mikrocebul

5.2.4. Zakażenia w kulturach

Procentowy wykaz, jaki wpływ dodatku antybiotyku czy zmiany metody odkazania

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

6.1. Śnieżycza karpacka

6.2. Szachownica kostkowata

6.3. Porównanie obu gatunków

7. WNIOSKI I MOŻLIWOŚCI ROZWOJU DOŚWIADCZENIA

- roślina z Źródowiska a ilość zakażeń
- istota opracowania szczegółowych metod prowadzenia kultur, jak niewielkie niuanse wpływają na ilość otrzymanych mikroroślin
- jaki eksplantat (rodzaj) przyniósł najlepsze rezultaty
- który z gatunków rozmnaża się lepiej
- co dalej, jak można rozwinąć pracę (opracowanie pożywek do innych typów esplantatów, somatyczna embriogeneza, kultury kalusa)
- sposoby optymalizacji procesu
- okorzenianie mikrocebul,
- aklimatyzacja

- [x1] - <https://pl.pinterest.com>
- [x2]- [<http://www.delta-intkey.com/>]
- [x3] - <http://geoserwis.gdos.gov.pl>
- [x4] - <https://www.flickr.com/>

8. LITERATURA

- [1] – Stefan Malepszy, *Biotechnologia roślin*, KDC, Warszawa 2017.
- [2] – Dariusz J. Michalczyk, *Wykłady i ćwiczenia z roślinnych kultur in-vitro*, Olsztyn, 2011.
<http://www.wbp.olsztyn.pl/~krist/skrypt/>
- [3] – Zbigniew Mirek, Halina Piękoś-Mirkowa, *Czerwona Księga Karpat Polskich - Rośliny Naczyniowe*, Instytut Botaniki PAN, Kraków 2008
- [4] – Y.P.S. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 40 Springer 1997,
N. Zagorska Micropropagation of *Leucojum aestivum* L.(Summer Snowflake)
- [5] – Agata Ptak, *Leucojum aestivum* L. *in vitro* bulbs induction and acclimatization, Agricultural University, Kraków, 2014
- [6] – Marija Petrić, *Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of Fritillaria meleagris in bulb scale culture*, University of Belgrade, Belgrade, 2014
- [7] – Marija Nikolić, *Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of Fritillaria meleagris bulbs formed in culture in vitro*, "Siniša Stanković" Institute for Biological Research, Belgrade, 2008
- [8] – Suleyman Kizil, *Accelerated micropropagation of endemic Fritillaria Aurea schott*, Ankara University, Ankara, 2016
- [9] – D. S. Muraseva, *In Vitro Propagation and Conservation of Rare Species Fritillaria meleagris* L. *from Floral Explants*, Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, 2015