



Wykorzystanie kultur spor w wegetatywnym mnożeniu paproci drzewiastych z rodzaju *Cyathea*

Katarzyna Goller, Jan J. Rybczyński

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

The application of spor culture in vegetative propagation of tree ferns of *Cyathea* genus

Summary

Multiplication of tree ferns using the traditional methods, i.e. the sowing of spores, is a very difficult task, characterised by low efficiency. It seems that *in vitro* culture of gamatophyte could be employed to overcome these difficulties. Experiments with vegetative propagation of tree ferns have been carried out in our lab over the last few years. The following species *C. australis* (R.Br), *C. brownii* (Domin), *C. capensis*, *C. dealbata* (G.Forst.)SW., *C. dregei* Kunze, *C. gigantea*, *C. medullaris*, *C. smithii* Hook f., *C. spinulosa*, *Cyathea* sp. Sm were the subjects of our studies. Experiments were carried out with the use of two basal agar media: Murashige and Skoog (1962) and Knop medium. Various concentrations of minerals of the studied media were used. It was proved that the time required for the germination of sown spores on agar medium depended on the species and concentration of used mineral ingredients of the studied media. Finally, numerous plants were obtained only from *C. australis* and *C. Cooperi*.

Key words:

fern, gamatophyte, vegetative propagation.

Adres do korespondencji

Katarzyna Goller,
Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania
Różnorodności
Biologicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Prawdziwka 2,
02-973 Warszawa.

1. Wstęp

Flora świata jest stosunkowo uboga w paprocie drzewiaste, a ich występowanie ogranicza się tylko do strefy tropikanej. Rozmnażanie paproci drzewiastych tradycyjną metodą poprzez wysiew zarodników do podłoża jest trudne i mało wydajne. Metoda

kultur *in vitro* może stanowić, jak się wydaje, pewną alternatywę, która jednak nie- sie w sobie szereg trudności w wyprowadzaniu w pełni zregenerowanego sporofitu. Temat rozmnażania paproci drzewiastych jest rzadko prezentowany w literaturze fachowej, stąd też podjęto szereg eksperymentów mających na celu rozwinięcie systemu uzyskiwania nieograniczonej liczby osobników na bazie mnożenia gametofitów i wyprowadzenia roślin sporofitu.

2. Materiał i metody

Do badań użyto wysterylizowanych zarodników następujących gatunków z rodzaju *Cyathea*; *C. australis* (R.Br.), *C. brownii* (Domin), *C. capensis*, *C. cooperi*, *C. dealbata* (G. Forst.)SW., *C. dregei* (Kunze), *C. gigantea*, *C. medullaris*, *C. smithii* Hook f., *C. spinulosa*, *Cyathea* sp. Sm. (tab. 1). Sterylizację zarodników prowadzono stosując 10% Dometos oraz sterylną wodę. Po każdym traktowaniu zarodniki wirowano w celu osadzenia ich na dnie próbówki, co ułatwiało wymianę roztworów sterylizujących i wody. Zarodniki wysiewano na pożywki agarowe zawierające różne stężenia soli mineralnych pożywek Murashige i Skoog (1) i Knopa bez substancji wzrostowych. Początkowo kultury prowadzono na szalkach Petriego (2).

Tabela 1

Efektywność rozmnażania paproci drzewiastych rodzaju *Cyathea* inicjowanych kulturą zarodników w warunkach *in vitro*

| Gatunek | Kielkowanie zarodników | Gametofit | Sporofit | Rośliny <i>ex vitro</i> | Rośliny w uprawie |
|----------------------|------------------------|-----------|----------|-------------------------|-------------------|
| <i>C. australis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>C. cooperi</i> | + | + | + | + | + |
| <i>C. dealbata</i> | + | + | + | + | -*** |
| <i>C. brownii</i> | + | + | -* | -** | - |
| <i>C. capensis</i> | + | + | - | - | - |
| <i>C. dregei</i> | + | + | - | - | - |
| <i>Cyathea</i> sp. | + | + | - | - | - |
| <i>C. gigantea</i> | - | - | - | - | - |
| <i>C. medullaris</i> | - | - | - | - | - |
| <i>C. smithii</i> | - | - | - | - | - |
| <i>C. spinulosa</i> | - | - | - | - | - |

* znak minus oznacza brak zapłodnienia w warunkach *in vitro*,

** znak minus oznacza brak roślin w warunkach *ex vitro*,

*** znak minus oznacza brak roślin uprawianych w szklarni.

Dobrze wykształcone, zielone przedrośla przenoszono do słoików, które zawierały różne pożywki (tab. 2). W stadium proliferujących gametofitów kultury utrzy-

mywano przez co najmniej dwa lata. Kolejno sporofity przenoszono do dużych słoików z ziemią, a kulturę prowadzono w komorze hodowlanej o podwyższonej temperaturze do około 26°C. Rośliny następnie adaptowano i przenoszono do doniczek z lekką, żyzną ziemią z perlitem.

3. Wyniki i dyskusja

W ciągu 5 lat do eksperymentów użyto zarodników 11 gatunków paproci z rodzaju *Cyathea*. W tabeli 1 przedstawiono gatunki, których zarodniki były zdolne do kiełkowania w stworzonych warunkach. Z 11 wysianych gatunków tylko zarodniki siedmiu z nich skiełkowały, ale w różnych terminach. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że czas potrzebny do skiełkowania zarodników zależy od gatunku, a także od pożywki (tab. 2). Zarodniki *C. dregei* skiełkowały po dwóch miesiącach na wszystkich użytych pożywkach, najwięcej na pożywce 0,1 MS, a najmniej na pożywce 0,5 MS. *C. capensis* również najintensywniej skiełkowała na pożywce 0,1 MS. Zarodniki *C. capensis* i *C. australis* potrzebowały 4 miesięcy na skiełkowanie i wytworzenie gametofitów. Zarodniki *Cyathea* sp. (fot. 1) i *C. brownii* na pożywce Knopa zaczęły kiełkować znacznie wcześniej, bo już po miesiącu. Wielkość stężenia pożywki Knopa nie miała wpływu na efektywność kiełkowania zarodników.

Tabela 2

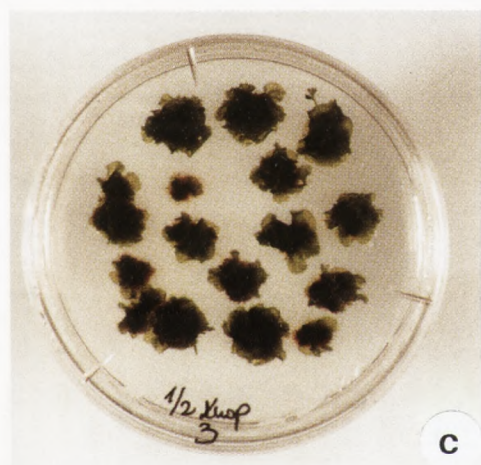
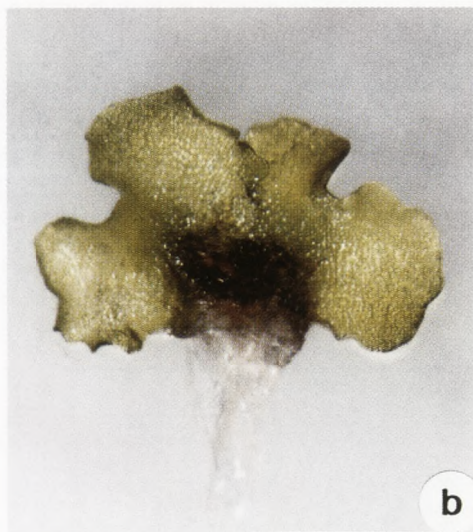
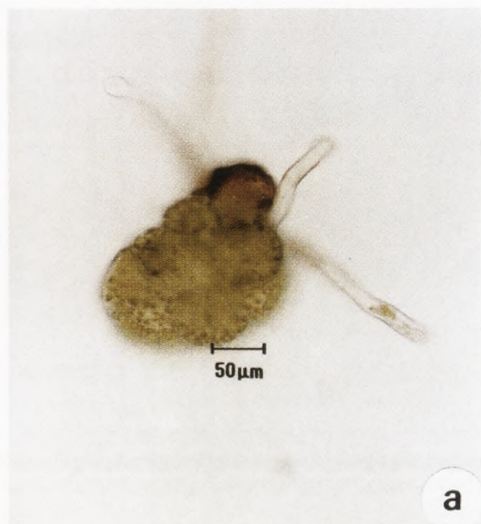
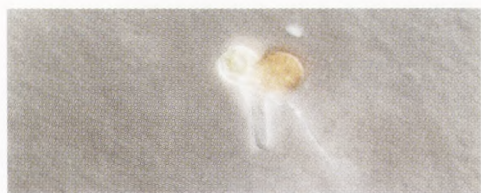
Kiełkowanie zarodników i kultura przedrośli wybranych gatunków paproci drzewiastych z rodzaju *Cyathea*

| Gatunek | Kiełkowanie zarodników | Czas kiełkowania | Rodzaj pożywki dla kultury przedrośli | | | Czas kultury |
|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|--------|----------|--------------|
| | | (miesiące) | MS0 | 0,5 MS | 0,5 Knop | |
| <i>C. australis</i> | MS0 | 4 | + | | | 4 lata |
| <i>C. cooperi</i> | MS0 | 4 | + | | | 4 lata |
| <i>C. dealbata</i> | MS0 | 1 | + | + | + | 3 lata |
| <i>C. brownii</i> | 0,5 MS | 2 | | + | + | 3 lata |
| | 0,1 MS | 2 | | | | |
| | 0,5 Knop | 1 | | | | |
| <i>C. capensis</i> | 0,5 MS | brak | | + | + | 3 lata |
| | 0,1 MS | 4 | | | | |
| | 0,5 Knop | brak | | | | |
| <i>C. dregei</i> | 0,5 MS | 2 | | + | | 3 lata |
| | 0,1 MS | 2 | | | | |
| | 0,5 Knop | 2 | | | | |
| <i>Cyathea</i> sp. | 0,5 MS | 3 | | + | | 3 lata |
| | 0,1 MS | brak | | | | |
| | 0,5 Knop | 1 | | | | |

Czas potrzebny na rozwój kielkującego zarodnika w pełni rozwinięty, płodny gametofit różnicował badane przez nas gatunki (fot. 1b). W kulturach *C. dealbata* w ciągu dwóch miesięcy stwierdzono występowanie sercowatych przedrośli na pożywce MSO. Pozostałe 6 gatunków potrzebowało od 4 do 6 miesięcy na wytworzenie gametofitu. Pożywka 0,5 Knopa wpływała na intensywność wzrostu i rozwoju przedrośli. Na tej pożywce przyrost świeżej masy gametofitów był najintensywniejszy (fot. 1c). Zauważono różnice w przyroście masy gametofitów w zależności od gatunku. Na przykład przyrost gametofitów *Cyathea* sp. był intensywniejszy niż *C. brownii*.

W stworzonych warunkach zachodziło spontaniczne zapłodnienie, rezultatem czego – po kilku lub kilkunastu tygodniach od inicjacji kultury gametofitów obserwowano rozwijające się sporofity. Spośród badanych jedenastu gatunków tylko w przypadku trzech, a mianowicie *C. australis*, *C. cooperi*, *C. dealbata* obserwowano początkowe stadia rozwijających się sporofitów (fot. 1d). Dotychczas zdołano wyprowadzić 350, 36, 22 sporofity kolejno dla wspomnianych gatunków. Hartowanie regenerantów sporofitu prowadzono w obecności pożywek o podniesionym poziomie czynnika żelującego pożywkę oraz przy obniżonym stężeniu źródła węgla organicznego – sacharozy.

Po wcześniejszej aklimatyzacji roślin w kulturach kilkuliściowe sporofity przenoszono do podłoża o odczynie kwaśnym. Ostatecznie niski procent sporofitów *C. australis* i *C. cooperi* zdołano zaadaptować do warunków szklarniowych. Proces aklimatyzacji roślin do warunków zewnętrznych jest ostatnim etapem w procesie rozmnażania, a jednocześnie najtrudniejszym. Powodzenie i wysoki stopień efektywności mikropropagacji zależy od wysokiego stopnia proliferacji na poziomie mikrorozmnażania, wysokiej jakości otrzymanych młodych roślinek przygotowanych do dalszej aklimatyzacji oraz wysokiego poziomu przeżycia roślin w czasie aklimatyzacji (3). Rośliny rozmnażane w kulturach *in vitro* rosną w małych naczyniach na pożywce, która zawiera dużo organicznych i nieorganicznych składników. W szczelnie zamkniętych naczyniach panuje wysoka wilgotność i wysoki poziom wymiany CO₂ i O₂. Te czynniki sprzyjają wysokiej proliferacji, ale także indukują występujące wśród otrzymanych roślin fizjologiczne, anatomiczne i morfologiczne anomalie, które następnie w połączeniu z aklimatyzacją i przesadzaniem roślin powodują niskie ich przeżywanie *in vivo* (4-6). Według wielu autorów przyczyną niepowodzeń w aklimatyzacji roślin jest różnica w anatomii i fizjologii tkanek roślinnych rosnących w naczyniach do mikrorozmnażania i roślin rosnących w szklarni lub w polu. U wielu gatunków liście roślin rosnących w kulturach mają mniej wosku na zewnętrznej kutikuli niż liście roślin rosnących w szklarni (7). Normalnie wosk na liściach chroni rośliny przed nadmierną utratą wody w warunkach naturalnych. Duże znaczenie ma także czynnik wysokiej wilgotności, która panuje w słoikach z pożywką (8). Po przeniesieniu roślin ze słoików wilgotność ta bardzo maleje, co powoduje zamieranie roślin. W literaturze podano, że młode rośliny powinny być aklimatyzowane najpierw w kulturach na specjalnie zmodyfikowanej pożywce. Należy podwyższyć poziom



Fot. 1. Kolejne stadia rozwojowe paproci drzewiastych z rodzaju *Cyathea*:

Fot. 1a. Kielkowanie zarodników po kilku miesiącach kultury na pożywce agarowej.

Fot. 1b. Pojedyncze przedrośle z wyraźnymi chwytnikami.

Fot. 1c. Kultura przedrośli na pożywce 0,5 Knopa.

Fot. 1d. Wykształcony sporofit z rozwijającym się młodym liściem w formie pastorału.



agaru, a obniżyć poziom sacharozy w pożywce i przenieść młodzieńskie rośliny na tak przygotowaną pożywkę na około 3 tygodnie lub dłużej. Najlepiej do momentu, gdy roślinki zaczną rozwijać nowe młode pastorały liści. Taka adaptacja wewnątrz kultury powinna uodpornić w pewnym stopniu rośliny na nowe warunki *in vivo* (9).

Literatura

1. Goller K., Rybczyński J. J., (1995), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 64, 13-17.
2. Murashige T., Skoog F., (1962), *Plant Physiol.*, 15, 473-497.
3. Ziv M., (1994), *Physiology, Growth and Development of Micropropagated Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 143-154.
4. Gaspar T., Kevers C., (1987), *Cell and tissue Culture in Forestry*, Eds. J. M. Bonga, D. J. Durzan, Vol. 1, Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 152-166.
5. Grout B. W. W., Aston H., (1997), *Hort. Res.*, 17, 1-7.
6. Sutter E., Langhans R., (1979), *J. Amer. Hort. Sci.*, 104, 493-496.
7. Ziv M., Debergh P. C., Zimmerman R.H., (1991a), *Micropropagation Technology and Application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 45-69.
8. Ziv M., (1991), *Israel. J. Bot.*, 40, 145-153.
9. Ziv M., (1995), *Automation and Control in Plant Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 493-516.