

Ochrona *ex situ* zagrożonych gatunków roślin na przykładzie działań Centrum Badań i Ochrony Roślin Górskich w Zakopanem

Ex situ conservation of endangered plant species in the Centre for Research and Conservation of Mountain Plants in Zakopane

MAGDALENA GAŚIENICA-STASZECZEK, PAWEŁ OLEJNICZAK

Instytut Ochrony Przyrody
Polska Akademia Nauk
31–120 Kraków, al. A. Mickiewicza 33
e-mail: gasienica@iop.krakow.pl, olejniczak@iop.krakow.pl

Słowa kluczowe: namnażanie roślin, kultury tkankowe *in vitro*, Tatry, Torfowiska Orawsko-Nowotarskie, ogród botaniczny.

Przedstawiono procedury i efekty namnażania wybranych, najbardziej zagrożonych i najrzadszych gatunków roślin Tatr i Podtatrza, w celu ich ochrony *ex situ* w warunkach Górskiego Ogrodu Botanicznego. Działaniami zostało objętych dwanaście gatunków – rozrzutka brunatna *Woodsia ilvensis*, sasanka słowacka *Pulsatilla slavica*, warzucha tatrzańska *Cochlearia tatrae*, głodek karyntyński *Draba siliquosa*, traganek zwisłokwiatowy *Astragalus penduliflorus*, zimoziół północny *Linnaea borealis*, przymiotno węgierskie *Erigeron hungaricus*, saussurea wielkogłowa *Saussurea pygmaea*, starzec cienisty *Senecio umbrosus*, sit trójłuskowy *Juncus triglumis*, turzyca pchła *Carex pulicaris* oraz wełnianka delikatna *Eriophorum gracile*. W celu rozmnożenia gatunków stosowano bezpośredni wysiew nasion lub zarodników do ziemi, stymulowanie nasion lub zarodników do kiełkowania *in vitro* oraz mikrorozmnażanie roślin z fragmentów organów roślinnych. Uprawę gruntową wyprowadzono dla dziesięciu z wymienionych wyżej gatunków. Nadal trwają prace nad aklimatyzacją paproci rozrzutki brunatnej, a dla zimoziół północnych czynione są próby regeneracji roślin z powstałego kalusa. Otrzymane osobniki mogą stanowić materiał gotowy do introdukcji w ramach programów zasilania lub odtwarzania populacji na stanowiskach naturalnych, zgodnie z założeniami Globalnej Strategii Ochrony Roślin oraz Ustawy o ochronie przyrody.

Wstęp

Pojęcie ochrony *ex situ*, czyli ochrony gatunków poza miejscem ich naturalnego występowania, nie istniało w polskim systemie prawnym przed 2004 rokiem. Na szczeblu międzynarodowym ochrona *ex situ*, jako metoda zachowania bioróżnorodności, została usankcjonowana w odniesieniu do roślin w ramach Konwencji o różnorodności biologicznej (ang. Convention

on Biological Diversity, CBD), którą Polska ratyfikowała w 1995 roku. Konferencja Stron (najwyższy organ Konwencji) przyjęła w 2002 roku Globalną Strategię Ochrony Roślin, w której zapisane są m.in. dążenia (tzw. poziomy docelowe) mające zapewnić skuteczne zachowanie bioróżnorodności. Jednym z takich poziomów docelowych jest ochrona *ex situ* do roku 2020 co najmniej 75% zagrożonych gatunków roślin, a nie mniej niż 20% gatunków zagrożo-

nych ma być gotowa do wykorzystania w programach zasilania lub odtwarzania populacji. Uchwalona dwa lata później, aktualna Ustawa o ochronie przyrody (Ustawa 2004) wychodzi naprzeciw tym zobowiązaniom. Konieczność ochrony *ex situ* wynika obecnie wprost z jej zapisów i jest przypisana do ogrodów zoologicznych, botanicznych i banków genów.

Skutkiem uznania znaczenia ochrony *ex situ* roślin jest rozszerzanie od początku XXI wieku misji ogrodów botanicznych, które powinny w dużo większym stopniu realizować działania na rzecz ochrony gatunkowej roślin (Havens i in. 2006). Zadaniem to jest z powodzeniem realizowane w polskich ogrodach botanicznych. Jednym z pierwszych ośrodków, w którym ochronę *ex situ* w postaci banku genów rozpoczęto już na początku lat 90. XX wieku, jest Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Warszawie-Powsinie (Kapler i in. 2014). W działania związane z ochroną *ex situ* zagrożonych gatunków rodzimej flory angażuje się obecnie znaczna część instytucji zrzeszonych w Radzie Ogrodów Botanicznych i Arboretów w Polsce oraz wydziałów biologicznych na uniwersytetach. W Ogródku Botanicznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu organizowana jest cyklicznie międzynarodowa konferencja dotycząca ochrony *ex situ* roślin.

Ochrona roślin poza miejscem ich naturalnego występowania może być realizowana przy użyciu różnych metod (Guerrant i in. 2004). W bankach genów zwykle deponowane są nasiona (Walters i in. 2005) lub, jak w przypadku nasion *recalcitrant* (wrażliwych na odwodnienie), osie zarodkowe lub izolowane z nich jeszcze mniejsze elementy – plumule (Chmielarz i in. 2011). Gdy jest to niemożliwe, przechowywane mogą być pąki wegetatywne, stożki wzrostu czy zarodki somatyczne (Mikuła i in. 2013). Trzeba jednak pamiętać, że ostatecznym celem ochrony *ex situ*, nakreślonym również w Ustawie o ochronie przyrody, jest wprowadzenie utrzymywanego materiału biologicznego do środowiska przyrodniczego oraz wsparcie efektywnej ochrony gatunkowej *in situ*.

W niniejszej pracy skupiono się na tym aspekcie ochrony *ex situ*, którego efektem ma być stałe utrzymywanie osobników gotowych do introdukcji w ramach ewentualnych programów zasilania lub odtwarzania populacji na stanowiskach naturalnych. Przedstawiono działania podejmowane w Centrum Badań i Ochrony Roślin Górskich (CBIORG) Instytutu Ochrony Przyrody PAN, prowadzące do namnożenia i uprawy w warunkach Górskiego Ogrodu Botanicznego (GOB) wybranych, najbardziej zagrożonych i najrzadszych gatunków roślin z terenu Tatr i Podtatrza. Objęte ochroną gatunki opisano poniżej w grupach związanych z częstotnością ich występowania. Kategorie zagrożeń w odniesieniu do Karpat przyjęto według *Czerwonej księgi Karpat polskich* (Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008) oraz dla obszaru całego kraju – według *Polskiej czerwonej księgi roślin* (Kaźmierczakowa i in. 2014).

Starzec cienisty *Senecio umbrosus* należy w Polsce do gatunków wymarłych. W Polsce i Karpatach polskich wyginał na stanowisku naturalnym (EW). W 1993 roku przeniesiono jedyne osobniki z Doliny Chochołowskiej w Tatrach Zachodnich do ogrodu botanicznego przy siedzibie CBIORG. Po kilku latach, z nasion pozyskanych z rośliny macierzystej, otrzymano kolejne osobniki (Mirek 2008).

Rozrzutka brunatna *Woodsia ilvensis*, sasan-ka słowacka *Pulsatilla slavica* i traganek zwisłokwiatowy *Astragalus penduliflorus* – mają tylko jedno stanowisko lub zostały po 2000 roku potwierdzone tylko na jednym stanowisku w kraju. Rozrzutkę brunatną w Polsce i Karpatach polskich zaliczono do gatunków krytycznie zagrożonych (CR). Jedyne stanowisko tej paproci na górze Wdźar objęto ogólnopolskim monitoringiem przyrodniczym, a kilkukrotne próby wsiewania zarodników w szczeliny skał nie przyniosły oczekiwanych rezultatów i nie wykazały widocznych zmian liczebności populacji (Zarzycki 2008). Sasankę słowacką w Polsce i Karpatach polskich uznano za gatunek zagrożony (EN), umieszczony na europejskiej czerwonej liście roślin naczyniowych i światowej czerwonej liście gatunków zagrożo-

nych IUCN. W naszym kraju jest skrajnie rzadka, notowana wyłącznie na jednym stanowisku – w wąwozie Koryciska Wielkie w Tatrach Zachodnich. Traganek zwisłokwiatowy, zarówno w Karpatach polskich, jak i w skali całego kraju, zaklasyfikowano do gatunków krytycznie zagrożonych (CR). Roślina występuje tylko w Dolinie Smytniej w Tatrach. W latach 1998–2000 podejmowano próby powiększania populacji *in situ* poprzez bezpośredni wysiew nasion na stanowisku naturalnym oraz dosadzanie młodych osobników rozmnożonych *ex situ*. Ze 120 introdukowanych osobników do 2008 roku zaledwie osiem przeżyło, kwitło i owocowało (Piękoś-Mirkowa i in. 2008).

Druga grupa roślin objęta badaniami to gatunki znane jedynie z dwu lub kilku stanowisk, z których większość zagrożona jest wyginieciem: warzucha tatrzańska *Cochlearia tatrae*, głodek karyntyjski *Draba siliquosa*, zimoziół północny *Linnaea borealis*, saussurea wielkogłowa *Saussurea pygmaea* i sit trójłuskowy *Juncus triglumis*. Warzucha tatrzańska to gatunek zagrożony na terenie Polski (EN), w polskich Karpatach narażony na wyginiecie (VU), umieszczony na europejskiej czerwonej liście roślin naczyniowych i światowej czerwonej liście gatunków zagrożonych IUCN. Rośnie wyłącznie w Tatrach Wysokich, w okolicach Morskiego Oka oraz Doliny Pięciu Stawów Polskich. Głodek karyntyjski został zaliczony do gatunków krytycznie zagrożonych (CR) – zarówno w Polsce, jak i Karpatach polskich. Znany jest jedynie z Tatr Wysokich, podawany na zboczu Grani Żabiego oraz na Wołoszynie. Należy do najrzadszych składników flory Polski, a niska liczebność populacji i bardzo mała powierzchnia występowania uzasadniają zabezpieczenie gatunku *ex situ* (Delimat, Borucki 2008). Zimoziół północny rośnie na ponad 150 stanowiskach na niżu oraz kilku w Sudetach i Tatrach. W Karpatach polskich stanowi gatunek krytycznie zagrożony (CR). Podawany jest z jednego stanowiska na Babiej Górze oraz z dwu stanowisk w Tatrach: na Kobylarzu i w Dolinie Rybiego Potoku, poniżej Morskiego Oka, z których tylko to drugie w ostatnich latach

zostało potwierdzone. Na tym stanowisku zimoziół północny tworzy płat o średnicy kilku metrów, kwitnie sporadycznie i nie tworzy nasion. Badania zmienności genetycznej wykonane techniką AFLP sugerują, że płat ten składa się z dwóch klonów powstałych prawdopodobnie w wyniku rozrostu wegetatywnego dwóch osobników (dane niepublikowane), co może ograniczać produkcję nasion u tego ściśle obcopolnego gatunku (Scobie, Wilcock 2009). Saussurea wielkogłowa należy do gatunków zagrożonych (EN), zarówno w polskich Karpatach, jak i na terenie całego kraju. W Polsce spotykana jest jedynie na kilkunastu stanowiskach w Tatrach, tworząc skrajnie małe populacje. Sit trójłuskowy należy do gatunków krytycznie zagrożonych (CR) zarówno w Polsce, jak i Karpatach polskich. Rośnie jedynie w Tatrach, gdzie znany jest z ośmiu stanowisk (okolice Czarnego Stawu powyżej Morskiego Oka, kocioł pod Mięgoszowieckim, Kasprowy Wierch, Dolina Litworowa, Uplążańska Kopa, Mała Świstówka oraz dwa stanowiska w Dolinie Małej Łąki).

Dwa gatunki spośród objętych działaniami są roślinami torfowiskowymi – turzyca pchła *Carex pulicaris* i wełnianka delikatna *Eriophorum gracile*. Turzyca pchła w Polsce i Karpatach polskich posiada status gatunku zagrożonego (EN). Najczęściej była notowana w północno- i południowo-zachodniej części kraju. W Karpatach polskich znana jest z kilkunastu stanowisk. Wełnianka delikatna z kolei to gatunek w Polsce i Karpatach polskich krytycznie zagrożony (CR), umieszczony na europejskiej czerwonej liście roślin naczyniowych. W polskich Karpatach wyginęła na większości stanowisk. W Kotlinie Orawsko-Nowotarskiej znana jest jedynie z trzech miejsc: okolic torfowisk Baligówka, Puścizny Wielkiej oraz okolic wsi Chyżne.

W CBIORG prowadzone są również prace nad gatunkami niższego ryzyka, jak przymiotno węgierskie *Erigeron hungaricus*, które w Karpatach polskich ma status gatunku niższego ryzyka (LR), jednak w skali całego kraju jest bliskie zagrożenia (NT). Rośnie na kilku-

dziesięciu stanowiskach, wyłącznie w Tatrach Wysokich i Zachodnich.

Stosowane metody

Ochroną *ex situ* objęto dwanaście gatunków: jedną paproć – rozrzutkę brunatną oraz rośliny nasienne – sasanek słowacką, warzuchę tatrzańską, głodek karyntyjski, traganek zwisłokwiatowy, zimozioł północny, przymiotno węgierskie, saussureę wielkoglową, starzec cienisty, sit trójłuskowy, turzycę pchłą oraz wełniankę delikatną.

Materiałem wyjściowym do namnożenia wybranych gatunków były nasiona, zarodniki lub fragmenty organów roślinnych pobrane bezpośrednio na stanowiskach naturalnych lub z roślin będących już w uprawie Górskiego Ogrodu Botanicznego. Większość materiału wyjściowego pochodziła z projektu POIS.05.01.00-00-152/09-00, realizowanego w ramach programu operacyjnego Infrastruktura i Środowisko.

W celu rozmnożenia gatunków stosowano trzy metody: bezpośredni wysiew nasion lub zarodników do ziemi, stymulowanie nasion lub zarodników do kiełkowania *in vitro* oraz mikrorozmnażanie roślin z fragmentów organów roślinnych. Pierwsza z wymienionych metod polegała na oczyszczeniu materiału siewnego, bezpośrednim jego wysianiu do ziemi w doniczkach torfowych i utrzymywaniu wilgotności podłoża. Po skiełkowaniu nasion siewki pikowano i uprawiano do czasu uzyskania osobników odpowiedniej wielkości. Następnie rośliny przesadzano do ogrodu, na specjalnie przygotowane stanowiska, jak najbardziej zbliżone do warunków naturalnych, m.in. skalniaki wapienne lub granitowe albo fragmenty terenu podmokłego o podłożu torfowym.

W przypadku braku nasion, ich niedostatecznej ilości lub trudności związanych z ich kiełkowaniem stosowano dwie pozostałe metody. Prace były wówczas prowadzone lub wspomagane w warunkach laboratoryjnych. Procedura w obydwu przypadkach obejmowała kilka etapów:

- inicjacja kultury *in vitro* – etap obejmujący wybór wyjściowego materiału roślinnego, jego

powierzchniowe odkażanie oraz wyłożenie eksplantatów na sztuczne podłoża hodowlane;

- namnażanie *in vitro* – polega na systematycznym (co 4–8 tygodni) pasażowaniu eksplantatów na świeże pożywki, odbywa się w specjalnych naczyniach przeznaczonych do kultur *in vitro*, umieszczonych w komorach klimatycznych;

- adaptacja roślin do warunków naturalnych – poprzedzone etapem ukorzenia hartowanie i przygotowanie powstałych *in vitro* roślin do sadzenia do ziemi i ogrodu, osiągnięta poprzez modyfikacje składu podłoża oraz zewnętrznych warunków;

- uprawa roślin w ogrodzie na stanowiskach najbardziej odpowiadających warunkom naturalnym.

Każdy z gatunków wymagał indywidualnego podejścia. W opracowywaniu sposobu namnażania w warunkach *in vitro* w dużej mierze uwzględniono informacje zawarte w dostępnych źródłach publikowanych, dotyczące konkretnych gatunków bądź gatunków blisko im spokrewnionych (Luo, Jia 1998; Catanà i in. 2010; Xing i in. 2010; Kaviani i in. 2011) oraz informacje zgromadzone w bazie danych Królewskiego Ogrodu Botanicznego w Kew (<http://data.kew.org/sid/>; sasanek wiosenna, głodek żółty, traganek jasny, przymiotno węgierskie, sit trójłuskowe, turzycza pchła, wełnianka delikatna). Konieczny był dobór skutecznej i zarazem nieniszczącej tkanek metody sterylizacji materiału roślinnego, a w przypadku kultur zakładanych z nasion – także zabiegów wspomagających kiełkowanie, takich jak stratyfikacja czy skaryfikacja. Przygotowanie podłoża o odpowiednim składzie chemicznym oraz zapewnienie optymalnych zewnętrznych warunków klimatycznych (temperatura, fotoperiod) decydowało o kierunku rozwoju eksplantatów. Aklimatyzacja wszystkich ukorzenionych *in vitro* roślin przebiegała w komorze klimatycznej. Podczas 6-stopniowego cyklu dzień trwał 13 godzin, a temperatura zmieniała się stopniowo: 12, 19, 24, 19°C, z kolei w nocy, utrzymywanej przez 11 godzin, temperatura wynosiła początkowo 10, a następnie 7°C.

Informacje dotyczące ilości wykorzystanego materiału roślinnego, typu izolowanych eksplantatów, rodzaju stosowanych pożywek hodowlanych oraz zewnętrznych warunków klimatycznych kiełkowania nasion lub zarodników i prowadzenia kultur tkankowych zestawiono w tabelach 1 i 2. Przedstawiono wyni-

ki uzyskane podczas prób opracowania procedur namnażania poszczególnych gatunków, z podziałem na metody, jakimi udało się rozmnożyć. Podano również liczbę osobników otrzymanych i przeznaczonych do aklimatyzacji w ziemi oraz ostatecznie – wysadzonych do gruntu w ogrodzie.

Tab. 1. Namnażanie wybranych gatunków z nasion lub zarodników

Table 1. Propagation of selected species from seeds or spores

Gatunek Species	Bezpośredni wysiew do ziemi Direct sowing into the ground		Stymulowanie do kiełkowania <i>in vitro</i> Stimulation of <i>in vitro</i> germination			
	LN	LO	LN	Warunki kiełkowania ¹ Germination conditions	LR	LO
Rozrzutka brunatna <i>Woodsia ilvensis</i>	— ²	—	— ³	0,5 MS (sucrose 20 g/l); 20°C, 8/16 h	12 ⁴ + ~200 ⁵	—
Sasanka słowacka <i>Pulsatilla slavica</i>	100	8	76	lignina/ cellulose wadding; 20°C, 8/16 h	9	9
Warzucha tatrzańska <i>Cochlearia tatrae</i>	100	10	312	agar 1%; 20°C, 8/16 h	170	84
Głodek karyntyjski <i>Draba siliquosa</i>	—	—	140	agar 1%; 25/10°C, 8/16 h	37	20
Traganek zwistokwiatowy <i>Astragalus penduliflorus</i>	100	60	599	agar 1%; 20°C, 8/16 h	221	106
Przymiotno węgierskie <i>Erigeron hungaricus</i>	—	—	177	agar 1%; 20°C, 8/16 h	6	5
Saussurea wielkogłowa <i>Saussurea pygmaea</i>	100	1	551	agar 1%; 20°C, 8/16 h	5	4
Starzec cienisty <i>Senecio umbrosus</i>	100	34	110	agar 1%; 20°C, 8/16 h	31	25
Sit trójłuskowy <i>Juncus triglumis</i>	—	—	513	agar 1%; 21°C, 12/12 h; 20°C, 8/16 h	498	42
Turzyca pchła <i>Carex pulicaris</i>	—	—	183	agar 1%; 33/19°C, 12/12 h	97	89
Wełnianka delikatna <i>Eriophorum gracile</i>	—	—	20	agar 1%; 33/19°C, 12/12 h	7	1

Objaśnienia skrótów: LN – liczba wysianych nasion, LO – liczba roślin wysadzonych do ogrodu, LR – liczba otrzymanych roślin, MS – Murashige i Skoog (1962).

¹ Dla przykładu: 20°C, 8/16 h oznacza, że nasiona inkubowano w temperaturze 20°C, w świetle przez 8 godzin, w ciemności przez 16 godzin; 33/19°C, 12/12 h – nasiona były utrzymywane w świetle w temperaturze 33°C, w ciemności w temperaturze 19°C z 12-godzinny fotoperiodem.

² Liczba niepoliczalna – zarodniki wysypane z zarodni znajdujących się na kilku liściach pochodzących z kilku osobników.

³ Liczba niepoliczalna – zarodniki wysypane z zarodni znajdujących się na 4 liściach pochodzących z jednego osobnika.

⁴ Liczba sporofitów ukorzenionych.

⁵ Liczba sporofitów przeznaczonych do ukorzenienia.

Explanation of abbreviations: LN – number of seeds, LO – number of individuals planted in the garden, LR – number of cultivated plants, MS – Murashige and Skoog (1962).

¹ For example: 20°C, 8/16 h means that seeds were incubated at 20°C, in the light for 8 hours and in the dark for 16 hours; 33/19°C, 12/12 h – seeds were kept in the light at 33°C and in the dark at 19°C with a 12-hour photoperiod.

² Indefinite number – spores sown from sporangia located on a few leaves from several individuals.

³ Indefinite number – spores sown from sporangia located on 4 leaves from a single individual.

⁴ Number of rooted sporophytes.

⁵ Number of sporophytes ready to root.

Tab. 2. Mikrorozmnażanie wybranych gatunków z fragmentów organów roślinnych

Table 2. Micropropagation of selected species from fragments of plant organs

Gatunek <i>Species</i>	Rodzaj eksplantatu wyjściowego <i>Type of primary explant</i>	Liczba eksplantatów <i>Number of explants</i>	Warunki kultury <i>in vitro</i> ¹ dla indukcji i namnażania kalusa <i>In vitro culture conditions for induction and proliferation of callus</i>
Warzucha tatrzańska <i>Cochlearia tatrae</i>	stożek wzrostu siewki <i>seedling apex</i>	1	MS + 2 mg/l KIN + 0,5 mg/l 2,4-D
Głodek karyntyjski <i>Draba siliquosa</i>	fragmenty kiełkujących siewek <i>fragments of germinating seedlings</i>	1	MS + 2 mg/l KIN + 0,5 mg/l 2,4-D
Traganek zwisłokwiatowy <i>Astragalus penduliflorus</i>	fragmenty hipokotyli kiełkujących siewek <i>hypocotyl fragments of germinating seedlings</i>	7	MS + 2 mg/l BAP
Zimoziół północny <i>Linnaea borealis</i>	fragmenty pędów, węzłów, pąków i ogonków liściowych <i>fragments of shoots, nodes, buds and petioles</i>	60 ²	MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D MS + 2 mg/l KIN + 0,5 mg/l 2,4-D MS + 2 mg/l KIN + 2 mg/l 2,4-D
Przymiotno węgierskie <i>Erigeron hungaricus</i>	siewka <i>seedling</i>	1	MS + 2 mg/l BAP ³

Objaśnienia skrótów: 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; BAP – 6-benzylaminopuryna; IAA – kwas indolilo-3-octowy; KIN – kinetyna; MS – Murashige i Skoog (1962); NAA – kwas naftylo-1-octowy.

¹Kultury prowadzono w komorach klimatycznych, w warunkach 20°C, 16/8 h. Metodologia jest w trakcie opracowywania i doskonalenia. Podane w tabeli składy pożywek dotychczas pozwoliły otrzymać najlepszy rezultat.

²Z dwóch pędów wyizolowano 30 fragmentów pędów, 7 węzłów, 17 pąków, 6 ogonków liściowych.

³Do regeneracji pąków przybyszowych najskuteczniejsze były pożywki: MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA oraz MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA; do ukorzenia MS + 0,5 mg/l NAA.

Explanation of abbreviations: 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BAP – 6-benzylaminopurine; IAA – 3-indoleacetic acid; KIN – kinetin; MS – Murashige and Skoog (1962); NAA – 1-naphthaleneacetic acid.

¹*Cultures were conducted in climate chambers at 20°C and for a 16/8 h photoperiod. The methodology is under development and improvement. Information provided in the table on in vitro cultures refers to the conditions that generated best results so far.*

²*A total of 30 pieces, 7 nodes, 17 buds, 6 petioles were isolated from two shoots.*

³*The most effective medium for regeneration of adventitious buds: MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA and MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA; for rooting: MS + 0,5 mg/l NAA.*

Wyniki

Rozrzutka brunatna

W laboratorium CBiORG kilkakrotnie podjęto próby otrzymania rozrzutki brunatnej z zarodników pochodzących z liści zebranych na stanowisku naturalnym, bezpośrednio wysiewanych do kuwet wypełnionych mieszanką ziemi i torfu. Za pomocą tej metody, po około 2 miesiącach, udało się uzyskać jedynie kilka sercowatych przedrośli. Pomimo starań i utrzymywania właściwej wilgotności podłoża, nie udało się uzyskać sporofitów.

W związku z niepowodzeniem uprawy grunтовой zainicjowano kulturę *in vitro* zarodników, bazując na metodzie opracowanej w Ogro-

dzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego (Kromer i in. 2008). Po kilku tygodniach pojawiły się pierwsze kiełkujące przedrośla. Gametofity w szybkim tempie namnażały się, tworząc bujne kępy. Po około 5 miesiącach zaobserwowano pierwsze sporofity (ryc. 1). Podczas kolejnych pasaży precyzyjnie izolowano młode paprocie. Krytyczny wydaje się etap oddzielenia sporofitu od gametofitu. W chwili niedostatecznego oczyszczenia sporofitu przedrośle kontynuuje namnażanie, zagłuszając rozwój rośliny. Sporo sporofitów udało się odizolować skutecznie i ukorzeń. Obecnie trwają pierwsze próby sadzenia paproci do ziemi i ich aklimatyzacji.

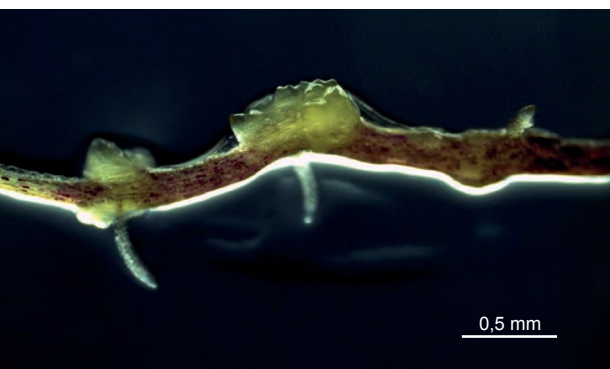


Ryc. 1. Młody sporofit rozrzutki brunatnej *Woodsia ilvensis* (7.01.2015 r., fot. P. Olejniczak)

Fig. 1. A young sporophyte of *Woodsia ilvensis* (7 January, 2015; photo by P. Olejniczak)

Sasanka słowacka

W CBiORG corocznie namnaża się sasan­kę słowacką z nasion, wysiewając je bezpo­średnio do gruntu w ogrodzie lub kiełkując nasiona *in vitro* na zwilżanej ligninie. W warun­kach laboratoryjnych nasiona kiełkują po oko­ło 4 tygodniach. Po przejściu okresu aklimaty­zacji w komorach klimatycznych rośliny wysa-



Ryc. 2. Kalus tworzący się na korzeniu gładka karyntyjskiego *Draba siliquosa* (25.11.2013 r., fot. M. Gąsienica-Staszczek)

Fig. 2. Callus developing on the root of *Draba siliquosa* (25 November, 2013; photo by M. Gąsienica-Staszczek)

dzane są do Górskiego Ogrodu Botanicznego. Pierwsze osobniki zakwitły i owocowały trzy lata po kiełkowaniu nasion. Podejmowano wiele prób przełamania spoczynku nasion sasan­ki słowackiej na podłożu agarowym. Stosowano pożywki z dodatkiem kwasu giberelinowego oraz testowano różne sposoby skaryfikacji łupiny nasiennej – dotychczas bezskutecznie.

Warzucha tatrzańska

Gatunek znajduje się w uprawie w Górskim Ogrodzie Botanicznym. Roślina z sukcesem namnażana jest z nasion zebranych w terenie, bezpo­średnio wysiewanych do ziemi w doniczkach oraz na podłożu agarowym. W warunkach laboratoryjnych konieczny okazał się etap susze­nia nasion pod nawiewem sterylnego powietrza komory laminarnej, po dezynfekcji powierzch­niowej, przed wyłożeniem na pożywkę. *In vitro* kiełkowa­ła około połowa nasion. Odnotowano spory udział nasion pustych. Rośliny zaaklimaty­zowane i wysadzone do ogrodu zakwitły obficie w drugim roku, wydając nasiona.

W CBiORG rozpoczęto prace nad namna­żaniem warzuchy tatrzańskiej wegetatywnie z tkanek rośliny. Na wyizolowanym stożku wzrostu siewki uzyskano i namnożono kalus. Podjęto pierwsze próby regeneracji roślin.

Głodek karyntyjski

Głodek karyntyjski namnaża się w CBiORG z nasion zebranych na stanowisku naturalnym. Na podłożu agarowym kiełkowało około 30% nasion, po kilku tygodniach od wysiania. Większą skuteczność odnotowano w przypadku nasion wcześniej stratyfikowanych w temperatu­rze +4°C. Najtrudniejszym etapem było wysa­dzanie do ziemi i solidne ukorzenianie niewiel­kich siewek o delikatnych korzeniach. Po akli­matyzacji i przeniesieniu do ogrodu rośliny w roku następnym zakwitły i wydały nasiona.

Podjęto pierwsze próby mikrorozmnażania gładka karyntyjskiego. Wyprowadzono kultu­rę kalusa na fragmentach kiełkujących siewek (ryc. 2). Kontynuowane będą prace nad zrege­nerowaniem roślin potomnych.

Traganek zwisłokwiatowy

Traganek zwisłokwiatowy jest namnażany w laboratorium CBiORG na podłożu agarowym, z nasion zebranych w terenie. W przypadku tego gatunku doszedł etap skaryfikacji nasion w trakcie prowadzonych *in vitro* kultur. Część nasion kiełkowało bardzo szybko, część dopiero po lekkiej skaryfikacji łupiny nasiennej. Po przeprowadzonych testach odnotowano wpływ skaryfikacji nasion na jakość kiełkujących siewek. Nasiona nacinane po dezynfekcji, bezpośrednio przed wyłożeniem na agar, kiełkowały w ciągu 3 dni, dając blade, złej jakości siewki. Z kolei skaryfikacja po kilku tygodniach od założenia kultury przyniosła najlepszy rezultat. Pierwszy osobnik z zaaklimatyzowanych w ogrodzie roślin zakwitł i wydał nasiona dwa lata po kiełkowaniu nasion.

W CBiORG nasiona traganek zwisłokwiatowego wysiewa się również bezpośrednio do doniczek z ziemią, a następnie sadi na odpowiednie stanowisko w ogrodzie. Podjęto także pierwsze próby namnażania tego gatunku *in vitro* z tkanek rośliny. Dotychczas uzyskano kalus na fragmentach hipokotyli kiełkujących siewek.

Zimoziół północny

Z powodu niemożności pozyskania nasion na stanowisku naturalnym, w laboratorium CBiORG utrzymywana jest obecnie kultura kalusa, którą wyprowadzono na fragmentach pędów, węzłów, pąków i ogonków liściowych. Krytyczny był etap odkażania materiału roślinnego. Pierwsze próby założenia kultury kończyły się niepowodzeniem z powodu silnych zakażeń mikrobiologicznych. Skuteczna okazała się dwustopniowa sterylizacja: Line-Antybakteria 70 [etanol 70% z dodatkiem propan-2-olu (6,0g/100g) i propan-1-olu (0,7g/100g)] przez 3 minuty oraz 40% roztworem Domestosu (roztwór podchlorynu sodu zawierający około 4,6g/100g aktywnego chloru) przez 40 minut. Obydwa etapy oddzielono prze-

plukaniem materiału roślinnego w sterylnej wodzie destylowanej. Po zakończonej dezynfekcji przeprowadzono pięciokrotne, 15-minutowe płukanie. Obecnie trwają prace nad regeneracją roślin z namnożonego kalusa.

Przymiotno węgierskie

Uprawę przymiotna węgierskiego wyprowadzono z nasion wykładanych na podłożu agarowe. Nasiona kiełkowały po kilkunastu dniach. Rośliny dobrze aklimatyzowały się w ziemi i ogrodzie. Pomimo licznych prób, nie opracowano dotychczas zadowalającej metody sterylizacji materiału nasiennego. Podczas inicjacji kultur pojawiało się bardzo dużo zakażeń grzybiczych.

Równoległe, dążono do wsparcia uprawy przymiotna węgierskiego kulturą tkankową *in vitro*. Na siewce wyprowadzono kalus, a następnie z sukcesem namnożono niezróżnicowaną tkankę, zregenerowano pąki przybyszowe i uko-



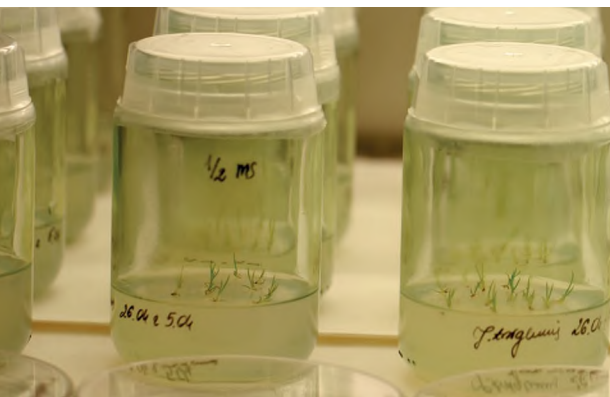
Ryc. 3. Przymiotno węgierskie *Erigeron hungaricus* w uprawie gruntowej w Górskim Ogrodzie Botanicznym w Zakopanem (23.06.2015 r., fot. M. Gąsienica-Staszczek)

Fig. 3. Erigeron hungaricus on the soil substrate in the Mountain Botanical Garden in Zakopane (23 June, 2015; photo by M. Gąsienica-Staszczek)



Ryc. 4. Ukorzeniony osobnik saussurei wielkogłowej *Saussurea pygmaea* – gotowy do aklimatyzacji na podłożu glebowym (20.06.2013 r., fot. P. Olejniczak)
Fig. 4. Rooted individual of *Saussurea pygmaea* – ready for acclimatization on the soil medium (20 June, 2013; photo by P. Olejniczak)

zreniono rośliny potomne. Z jednego nasiona udało się uzyskać 118 osobników, z czego 84 sztuki obecnie obficie kwitną i wydają nasiona w uprawie ogrodowej (ryc. 3). Ważną korzyścią opracowania metody mikrorozmnażania przymiotna węgierskiego jest to, że daje ona szansę powtórzenia sukcesu namnożenia blisko mu spokrewnionego i krytycznie zagrożonego, zarówno w Karpatach polskich, jak i na terenie ca-



Ryc. 5. Kielkujące nasiona situ trójłuskowego *Juncus triglumis* (8.05.2013 r., fot. P. Olejniczak)
Fig. 5. Germinating seeds of *Juncus triglumis* (8 May, 2013; photo by P. Olejniczak)

łego kraju, przymiotna alpejskiego *Erigeron alpinus* subsp. *intermedius*.

Saussurea wielkogłowa

Saussurę wielkogłową otrzymano z nasion, zarówno poprzez bezpośredni ich wysiew do doniczek z ziemią, jak również na podłożu agarowym (ryc. 4). Nasiona zaczęły kiełkować po kilku tygodniach. Uzyskano niewiele siewek, ponieważ większość zebranych w terenie nasion okazała się źle wykształcona. Dotychczas, z kilku otrzymanych i wysadzonych do ogrodu osobników, dwa zaaklimatyzowały się. Jeden z nich zakwitł i owocował dwa lata po wykiełkowaniu nasiona. Co ciekawe, ponad 80% nasion zebranych z tego osobnika wydaje się wykształcona prawidłowo. Efektywność produkcji nasion jest więc przypuszczalnie ograniczona nie przez rozproszenie populacji, a czynnikami związanymi np. z zasobnością siedliska lub obecnością zapylaczy.

Starzec cienisty

Nasiona starca cienistego, zebrane z roślin będących w uprawie Górskiego Ogrodu Botanicznego, kiełkowały zarówno bezpośrednio wysiane do ziemi w doniczkach, jak i na podłożu agarowym. W warunkach *in vitro* nasiona kiełkowały już po kilku dniach. Z zaaklimatyzowanych i wysadzonych do ogrodu 25 roślin, pierwszy osobnik zakwitł dwa lata po kiełkowaniu nasion.

Sit trójłuskowy

W warunkach laboratoryjnych kiełkowało blisko 100% nasion situ trójłuskowego, już po kilku dniach od wysiania (ryc. 5). Jedyne napotkany w pracy nad tym gatunkiem problem pojawił się po posadzeniu skielkowanych *in vitro* siewek do ziemi. Rośliny z bardzo krótkimi i delikatnymi korzeniami łatwo ulegały wypłukaniu podczas podlewania, co uniemożliwiało ukorzenienie. Osobniki zaaklimatyzowane, po osiągnięciu odpowiedniej wielkości posadzono na przygotowane stanowisko w ogrodzie. Zakwitły w trzecim roku, wydając nasiona.

Turzyca pchla

In vitro, po kilku tygodniach od siewu, kiełkowało około 70% nasion turzycy pchlej. Przed sterylizacją konieczna była delikatna skaryfikacja i usunięcie okrywy nasiennej. Rośliny zaaklimatyzowane do warunków naturalnych i na odpowiednio dobranym siedlisku w ogrodzie zakwitły w roku następnym po kiełkowaniu nasion.

Wełnianka delikatna

W CBIORG wełniankę delikatną rozmnożono z nasion zebranych na stanowiskach naturalnych. Nasiona kiełkowały na podłożu agarowym już po upływie kilku dni. Po posadzeniu siewek do ziemi w doniczkach i aklimatyzacji, rośliny przeniesiono do torfowiska utworzonego na terenie ogrodu.

Podsumowanie

Spośród dwunastu gatunków roślin, które objęto badaniami w ramach ochrony *ex situ*, uprawę gruntową wprowadzono dla dziesięciu gatunków: sasanki słowackiej, warzuchy tatrzańskiej, głodka karyntyjskiego, traganka zwisłokwiatowego, przymiotna węgierskiego, saussurei wielkogłowej, starca cienistego, situ trójjuskowego, turzycy pchlej, wełnianki delikatnej. Wymienione gatunki namnażano w warunkach laboratoryjnych CBIORG z nasion zebranych na stanowiskach naturalnych. Jedynie materiał nasienny starca cienistego pochodził z osobników będących w uprawie Górskiego Ogrodu Botanicznego. Nasiona kiełkowały na podłożu agarowym, z wyjątkiem sasanki słowackiej, której siewki uzyskano na zwilżanej ligninie. Nasiona czterech gatunków (warzuchy tatrzańskiej, traganka zwisłokwiatowego, saussurei wielkogłowej oraz starca cienistego) kiełkowały również po bezpośrednim ich wysiewie do doniczek z ziemią, a także wysiane do gruntu w ogrodzie (sasanki słowackiej). Dla warzuchy tatrzańskiej, głodka karyntyjskiego, traganka zwisłokwiatowego oraz przymiotna węgierskiego podjęto równoległe próby ich mikro-rozmnażania. Uzyskano sterylne kultury oraz

kalus, a w przypadku przymiotna węgierskiego z pąków przybyszowych zregenerowano rośliny i poddano je aklimatyzacji. Otrzymane osobniki zaaklimatyzowały się w ogrodzie, kwitną i owocują. Dwa gatunki spośród objętych badaniami: rozrzutka brunatna i zimozioł północny – nie zostały wprowadzone do gruntu. W związku z niepowodzeniem uprawy paproci, po bezpośrednim wysiewie zarodników do ziemi, zainicjowano kulturę *in vitro*. W chwili obecnej trwają prace nad aklimatyzacją tego gatunku. W przypadku zimoziołu północnego, z powodu niemożności pozyskania nasion na stanowisku naturalnym, do namnożenia wykorzystano techniki mikro-rozmnażania. W laboratorium CBIORG prowadzona jest kultura kalusa i czynione są próby regeneracji roślin potomnych.

Wspomaganie ogrodniczych metod namnażania roślin technikami laboratoryjnymi daje bardzo duże korzyści. W przypadku kiełkowania nasion bezpośrednio wysianych do ziemi nie ma możliwości precyzyjnego ustalenia warunków wzrostu, natomiast omija się szereg procedur koniecznych do uzyskania i utrzymania sterylnego materiału roślinnego oraz, często krytyczny, proces aklimatyzacji otrzymanych *in vitro* roślin. W warunkach laboratoryjnych każdy z etapów wymaga indywidualnego, specyficznego dla gatunku dopracowania, co, choć niekiedy pracochłonne, daje możliwość modyfikacji metody i otrzymania zadowalających rezultatów. Możliwe jest różnicowanie warunków kiełkowania nasion, zastosowanie odpowiednich podłoży hodowlanych, wzbogacanie ich składu czy stosowanie dodatkowych zabiegów inicjujących przełamanie spoczynku nasion. Zastosowanie technik mikro-rozmnażania jest niekiedy jedyną metodą umożliwiającą namnożenie populacji zagrożonych, w obrębie których nie występują osobniki kwitnące lub kwitną nie produkując nasion (Fay 1994).

Otrzymany w wyniku przeprowadzonych badań materiał roślinny będzie wykorzystany do namnożenia kolejnych pokoleń, co w perspektywie najbliższych lat powinno doprowadzić do uzyskania w gruncie Górskiego Ogrodu

Botanicznego stabilnych populacji wybranych gatunków. Uprawiane osobniki będą dobrym materiałem gotowym do introdukcji w ramach ewentualnych programów zasilania lub odtwarzania populacji na stanowiskach naturalnych. Aklimatyzacja sadzonek, prowadzona w warunkach zbliżonych do środowiska przyrodniczego, zwiększa szanse na powodzenie planowanych działań ochronnych *in situ*. Trzeba jednak pamiętać, że hodowla *ex situ* może prowadzić do zmian genetycznych utrzymywanego materiału. Możliwa jest losowa utrata zmienności genetycznej wynikająca z dryfu genetycznego, a jest ona tym wolniejsza, im większa jest liczebność populacji oraz im dłuższy jest czas trwania pokolenia. Utrzymaniu zmienności genetycznej sprzyja zatem wieloletni cykl życiowy charakteryzujący wszystkie objęte działaniami gatunki roślin. Zapobiegawczo, wskazana jest okresowa analiza zmienności genetycznej utrzymywanych populacji (Rucińska, Puchalski 2011). Gdy namnażanie roślin wspomagane jest metodami mikrorozmnażania, w kulturach tkankowych przechodzących stadium kalusa obserwuje się podwyższone tempo mutagenyzy (Rout i in. 2006). Ta dodatkowa zmienność, zwana somaklonalną, powinna być poddana kontroli w przypadku roślin przygotowywanych do wprowadzenia do środowiska naturalnego.

Podziękowania

Publikacja powstała dzięki wsparciu projektu NCN nr N N304 309240. Dziękujemy pani Marii Pacynie za pomoc i pracę przy uprawie roślin, prof. Krystynie Kromer za wsparcie przy namnażaniu *in vitro* rozrutki brunatnej oraz recenzentom – za cenne uwagi.

PIŚMIENICTWO

- Catană R., Ciucă M., Holobiuc I. 2010. Using RAPD techniques to check the genetic stability of *Erigeron nanus* Schur regenerants in the *ex situ* conservation context. *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie XVII*: 230–234.
- Chmielarz P., Michalak M., Pałucka M., Wasileńczyk U. 2011. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. *Plant Cell Reports* 30 (8): 1405–1414.
- Delimat A., Borucki T. 2008. *Draba siliquosa* M. Bieb. Głodek karyntyjski. W: Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. (red.). *Czerwona księga Karpat polskich. Rośliny naczyniowe*. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków: 146–147.
- Fay M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity and Conservation* 3 (2): 176–183.
- Guerrant E.O., Havens K., Maunder M. (red.). 2004. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington (DC).
- Havens K., Vitt P., Maunder M., Guerrant E.O. Jr., Dixon K. 2006. *Ex situ* plant conservation and beyond. *BioScience* 56: 525–531.
- Kapler A., Niemczyk M., Walerowski P., Krzyżewski A., Smieja A., Nowak A., Podyma W., Puchalski J. 2014. Banki nasion wobec starych i nowych wyzwań w ochronie roślin *ex situ*. Refleksje w 20. rocznicę utworzenia Banku Nasion rodzimej flory Polski w Warszawie-Powsinie. *Wiadomości Botaniczne* 58 (3/4): 89–100.
- Kaviani B., Hesar A.A., Kharabian-Masouleh A. 2011. *In vitro* propagation of *Matthiola incana* (Brassicaceae) – an ornamental plant. *Plant Omnis Journal* 4: 435–440.
- Każmierczakowa R., Zarzycki K., Mirek Z. (red.). 2014. *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.
- Kromer K., Raj A., Żołnierz L., Poturała D. 2008. Propagation *in vitro* and *ex situ* cultivation of *Woodsia alpina* (Bolton) S.F. Gray. W: Szczęśniak E., Gola E. (red.). *Club mosses, horsetails and ferns in Poland – resources and protection*. Polish Botanical Society & Institute of Plant Biology, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław: 15–28.
- Luo J.P., Jia J.F. 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. *Plant Cell Reports* 17: 567–570.
- Mikuła A., Makowski D., Tomiczak K., Rybczyński J.J. 2013. Kultury *in vitro* i krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów. *Polish Journal of Agronomy* 14: 3–17.
- Mirek Z. 2008. *Senecio umbrosus* Waldst. & Kit. s.str. Starzec cienisty. W: Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. (red.). *Czerwona księga Karpat polskich. Rośliny naczyniowe*. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków: 404–405.

- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. (red.). 2008. Czerwona księga Karpat polskich. Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z., Delimat A. 2008. *Astragalus penduliflorus* Lam. Traganek zwłóknisty. W: Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. (red.). Czerwona księga Karpat polskich. Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków: 236–237.
- Rout G.R., Mohapatra A., Jain S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531–560.
- Rucińska A., Puchalski J. 2011. Comparative molecular studies on the genetic diversity of an *ex situ* garden collection and its source population of the critically endangered Polish endemic plant *Cochlearia polonica* E. Fröhlich. *Biodiversity and Conservation* 20: 401–413.
- Scobie A.R., Wilcock C.C. 2009. Limited mate availability decreases reproductive success of fragmented populations of *Linnaea borealis*, a rare, clonal self-incompatible plant. *Annals of Botany* 103: 835–846.
- Walters C., Wheeler L.M., Grotenhuis J.M. 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15 (1): 1–20.
- Xing Z.Y., Yuan H.Y., Wang L.F., Zheng L.P. 2010. Regenerating plants from *in vitro* culture of *Erigeron breviscapus* leaves. *African Journal of Biotechnology* 9 (26): 4022–4024.
- Zarzycki K. 2008. *Woodsia ilvensis* (L.) R. Br. Rozrzutka brunatna. W: Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. (red.). Czerwona księga Karpat polskich. Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków: 46–47.
- Ustawa 2004. Ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 roku o ochronie przyrody. Dz.U. 2004 Nr 92, poz. 880.
<http://data.kew.org/sid/>

SUMMARY

Chrońmy Przyrodę Ojczyzną 72 (1): 14–25, 2016

Gąsienica-Staszczek M., Olejniczak P. *Ex situ* conservation of endangered plant species in the Centre for Research and Conservation of Mountain Plants in Zakopane

The paper presents the results of propagation of selected, most endangered and rare plant species of the Tatra Mountains and their surroundings in the Mountain Botanical Garden in Zakopane. The species include: *Woodsia ilvensis*, *Pulsatilla slavica*, *Cochlearia tatrae*, *Draba siliquosa*, *Astragalus penduliflorus*, *Linnaea borealis*, *Erigeron hungaricus*, *Saussurea pygmaea*, *Senecio umbrosus*, *Juncus triglumis*, *Carex pulicaris* and *Eriophorum gracile*. Seeds or spores of the species were directly placed in the soil for germination or were disinfected and chemically or physically stimulated *in vitro*. In some cases, micropropagation techniques were used to derive cultures from vegetative tissues of the plants. Cultivation of *ex situ* populations in the garden was not accomplished in only two species. Sporophytes of the fern *W. ilvensis* have been successfully developed but they have not been acclimated to outdoor conditions yet. In the case of *L. borealis* which did not produce seeds in the Tatra population, we obtained an undifferentiated callus but further attempts are made to regenerate plants from the tissue. In all other cases, viable individuals have successfully initiated cultivation in the garden. These plants can now serve as a material for *in situ* conservation initiatives that rely on introduction of plants to the wild.