

„Krioprezerwacja nasion i wierzchołków wzrostu lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) jako metoda ochrony *ex situ*”

Streszczenie pracy doktorskiej mgr inż. Marty Urbaniec-Kiepura
Katedra Roślin Ozdobnych
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Lilia złotogłów jest gatunkiem chronionym, jednak liczebność osobników na stanowiskach naturalnych w Polsce maleje, co jest spowodowane zarówno czynnikami środowiskowymi, jak i antropologicznymi. Użycie nowoczesnej metody ochrony zagrożonych gatunków jakim jest krioprezerwacja, pozwoliłoby zachować materiał genetyczny lili złotogłów dla następnych pokoleń. Krioprezerwacja polega na długoterminowym przechowywaniu materiału w temperaturze $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, w ciekłym azocie. W tych warunkach–metabolizm komórek zostaje prawie całkowicie zahamowany, a materiał roślinny może być przechowywany bez żadnych zmian przez nieograniczony czas.

Przeprowadzone badania nad wykorzystaniem jednego ze sposobów krioprezerwacji do ochrony *ex situ* zagrożonego gatunku – lili złotogłów - opierały się o następującą hipotezę badawczą: lilia złotogłów może być poddana procesowi krioprezerwacji, a wykorzystana technika krioprezerwacji nie spowoduje zmian genetycznych u badanej rośliny.

Celem pracy była kompleksowa ocena lili złotogłów występującej w Babiogórskim Parku Narodowym w aspekcie: charakterystyki stanowisk naturalnych i cech biometrycznych roślin, opracowania skutecznej metody krioprezerwacji zagrożonego gatunku oraz zbadania jakości regenerantów.

Obserwacjami objęto rośliny należące do populacji lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) na północnym stoku Babiej Góry (Pozwolenie na badania nad roślinami chronionymi nr DLOPiK-OP/OGIZ-4211/I-1/218,2809/08/jr wydane przez Ministra Środowiska oraz pozwolenie nr 87/2008, pozwolenie nr 102/2011, pozwolenie nr 104/2012, pozwolenie nr 112/2012 wydane przez Dyrektora Babiogórskiego Parku Narodowego). Scharakteryzowano warunki biotyczne, edaficzne i świetlne pięciu wybranych stanowisk lili złotogłów. Oceniono liczebność i wiek populacji oraz wykonano pomiary biometryczne roślin.

Badania laboratoryjne polegały na opracowaniu techniki krioprezerwacji nasion i merystemów roślin lili złotogłów. Nasiona poddano krioprezerwacji zmodyfikowaną metodą dehydratacji i desykacji, rozwiniętą przez Kaviani i in. (2009). Merystemy uzyskano z eksplantatów cebulowych techniką *in vitro*, a do krioprezerwacji merystemów wykorzystano metodę witrifikacji w kropli, opracowaną przez Leunufna i Keller (2003) rozwiniętą przez Panis i in. (2005).

W przypadku obu wymienionych metod oceniono jakość materiału roślinnego po zakończonym procesie krioprezerwacji pod względem stopnia przeżycia i regeneracji, jak również cech morfologicznych uzyskanych regenerantów. Oznaczono fluorescencję chlorofilu za pomocą fluorometru Photosynthesis Field Analyzer MINI PAM 2000 Portable Chlorophyll Fluorometer (WALZ GmbH Germany) w programie komputerowym: WinControl Software for PAM Fluorometers), wydajność tlenową w procesie fotosyntezy (Plant Vital w programie

Plant Vital 3) oraz określono ploidalność roślin za pomocą cytometrii przepływowej w Cytometrze Partec CCA (Śliwińska, 2008).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że piętrowy zasięg występowania lili złotogłów na Babiej Górze na badanych stanowiskach sięga od 884 m n.p.m. do 1452 m n. p. m. Gleba na wybranych stanowiskach lili złotogłów charakteryzuje się niską zawartością fosforu i potasu, pH od 4,51 do 6,56. Stwierdzono występowanie zmienności demograficznej u lili złotogłów na poziomie lokalnym. Średnia wysokość roślin kwitnących badanej populacji lili wynosi od 67 cm do 92 cm, rośliny te mają od 14,0 do 17,6 liści i od 2 do 4 kwiatów. Frekwencja osobników w stadium generatywnym, liczba kwiatów w kwiatostanie oraz rozmiary kwiatu zależne są od warunków świetlnych badanego stanowiska oraz od jego wzniesienia nad poziomem morza. Im bardziej oświetlone stanowisko i niżej położone tym osobniki są bardziej okazałe, wyższe i posiadają kwiatostany z większą liczbą kwiatów.

Krioprezerwacja nie wpłynęła na zdolność kiełkowania nasion, natomiast spowodowała skrócenie średniego czasu kiełkowania nasion z 40,7 dni do 34,4 dni. Najlepiej kiełkowały nasiona poddane krioprezerwacji (100%) i przechowywane przed krioprezerwacją w temperaturze 15 °C, poddane dehydratacji i desykcji, albo nasiona przechowywane w tej samej temperaturze, poddane jedynie 5 h desykcji.

W przypadku krioprezerwacji merystemów lili złotogłów metodą witrifikacji w kropli wykazano, że przechowywanie cebul przybyszowych, z których pobierano merystemy w temperaturze 5 °C w 3 % roztworze sacharozy powoduje spadek stopnia przeżycia i regeneracji merystemów po krioprezerwacji z 65,0 % do 40,8 % oraz spadek stopnia regeneracji z 87,2 % do 75,0 % w porównaniu do materiału przechowywanego w temperaturze 20 °C na pożywce zawierającej 3 % sacharozy. Stwierdzono również, że traktowanie merystemów roztworem witrifikacyjnym PVS2 przez 30 minut, gwarantuje wysoką przeżywalność (80,4 %) i regenerację roślin lili (89,2 %).

Nie zaobserwowano zmian w fenotypie roślin, zarówno u siewek jak i u roślin powstałych z merystemów poddanych krioprezerwacji. Nie stwierdzono zmian w procesie fotosyntezy i w wielkości genomu w stosunku do kontroli.

Przeprowadzone badania wykazują, że zastosowane sposoby krioprezerwacji, to jest zmodyfikowana metoda dehydratacji i desykcji w przypadku nasion oraz metoda witrifikacji w kropli w przypadku merystemów wierzchołkowych mogą być z sukcesem wykorzystane do ochrony lili złotogłów w warunkach *ex situ*.

Wyniki badań opublikowano w :

1. Urbaniec M., Bach A., (2010) Charakterystyka ekologiczna populacji lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) na północnym stoku Babiej Góry. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 551: 399-405.
2. Urbaniec-Kiepusa M., Bach A., (2014) Effect of pre-storage on *Lilium martagon* L. seed longevity following cryopreservation. CryoLetters 35: 462-472.

3. Urbaniec-Kiepusa M., Bach A., (2017) Cryopreservation of *Lilium martagon* L. meristems by droplet vitrification and evaluation of their physiological stability. *CryoLetters* 38: 78-89.

4. Urbaniec M., Bach A., Śliwińska E. (2013) Effect of cryopreservation of the seeds of martagon lily (*Lilium martagon* L.) on the quality of seedlings. Program and Abstract: 2nd International Symposium on Plant Cryopreservation, Fort Collins, Colorado, USA, s. 59.