

3. Streszczenie

Viola stagnina Kit. jest gatunkiem zagrożonym wyginięciem w przeważającej części europejskiego zasięgu. W pracy przedstawiono wydajny protokół mikropropagacji oraz krioprezerwacji dla celu ochrony *ex situ* tego rzadkiego gatunku fiołka. Określono frekwencje komórek o różnej zawartości DNA w różnych eksplantatach, co umożliwiło dokonanie wyboru eksplantatu najodpowiedniejszego do założenia kultury *in vitro* czyli z największą liczbą komórek 2C. Fragmenty blaszek i ogonków liściowych hodowano na zestalonej agarze pożywce MS wzbogaconej w auksyny i cytokininy w różnych kombinacjach i stężeniach. Bezpośrednia organogeneza została zaindukowana z najwyższą frekwencją na pożywce z 0.5 mg l⁻¹ TDZ, zaś bezpośrednia oraz pośrednia (poprzez kalus) na pożywce z 1 mg l⁻¹ TDZ, co zostało potwierdzone poprzez analizę histologiczną oraz obserwacje w SEM. Pędy przybyszowe zostały ukorzenione na pożywce 1/2 MS z 2% sacharozy i 0.5 mg l⁻¹ IAA. Regeneranty przesadzono do ziemi ogrodowej i aklimatyzowano w warunkach laboratoryjnych. 65 spośród zregenerowanych roślin (72% z wyizolowanych pędów umieszczonych na pożywce ukorzeniającej) po przeniesieniu do warunków polowych na poletku doświadczalnym UJ przetrwało w dobrej kondycji kilka sezonów. Rośliny wytworzyły kwiaty chasmogamiczne oraz klejstogamiczne morfologicznie podobne do kwiatów roślin występujących w naturalnych populacjach, które były wykorzystane do założenia kultury, wydały nasiona z obydwu typów kwiatów w pierwszym, drugim oraz trzecim sezonie wegetacyjnym. Oszacowana przy użyciu testu histochemicznego żywotność pyłku zregenerowanych roślin była w przypadku większości roślin bardzo wysoka (ponad 90%), podobnie jak u roślin z naturalnego środowiska.

Pędy przybyszowe *V. stagnina* w różnych stadiach rozwoju zostały wykorzystane jako materiał wyjściowy do różnych technik krioprezerwacji. Wszystkie te metody doprowadziły, po rozmrożeniu materiału, do proliferacji kalusa i pośredniego

powstania pędów z różną wydajnością w kulturze *in vitro*. Kapsułkowanie/dehydratacja osmotyczna okazała się najbardziej wydajną techniką do krioprezerwacji materiału *V. stagnina* w ciekłym azocie.

Ocena stabilności genetycznej klonów po mikropropagacji i krioprezerwacji została przeprowadzona za pomocą markerów molekularnych ISSR. Zróżnicowanie genetyczne gatunku w dwóch naturalnych populacjach zostało oszacowane i wykorzystane jako punkt odniesienia dla regenerantów. Wśród roślin uzyskanych poprzez organogenezę wykryto zarówno rośliny zgodne jak i oddalone pod względem genetycznym od roślin wyjściowych, natomiast rośliny po krioprezerwacji wykazały zgodność genetyczną z genotypem rośliny macierzystej, co zostało przedstawione na diagramie PCoA relacji genetycznych. We wszystkich grupach klonów wartości parametrów genetycznych takich jak liczba genotypów, liczba markerów polimorficznych, H_j , H_T oraz H_S były niższe niż w naturalnych populacjach. Cytometria przepływowa wykazała w roślinach zregenerowanych poprzez organogenezę oraz po krioprezerwacji stałą wielkość genomu w stosunku do roślin z naturalnych populacji za wyjątkiem jednej autopoliploidalnej rośliny zregenerowanej po traktowaniu roztworem witryfikacyjnym PVS3.

Jest to pierwsze doniesienie o mikropropagacji oraz krioprezerwacji *V. stagnina*, z opracowanymi wydajnymi protokołami do wykorzystania w ochronie *ex situ* tego zagrożonego gatunku. Jest to również pierwsza szczegółowa analiza genetyczna zregenerowanych roślin z wykorzystaniem metod stosowanych w genetyce populacyjnej oraz pierwsze dane o wielkości genomu tego gatunku.

Kraków, 24.02.2017r.

