

**Klonowanie najstarszych dębów pomnikowych  
rosnących w Polsce z wykorzystaniem metody *in vitro***  
Cloning of the oldest monumental oaks growing in Poland  
using *in vitro* culture

SZYMON KOTLARSKI<sup>1</sup>, MARCIN MICHALAK<sup>1,2</sup>,  
PAWEŁ CHMIELARZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Parkowa 5, PL-62-035 Kórnik  
\*e-mail: pach@man.poznan.pl

<sup>2</sup>Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
ul. Michała Oczapowskiego 1A, PL-10-719 Olsztyn

Submitted: 8 July 2019; Accepted: 30 September 2019

**STRESZCZENIE:** W ostatnich latach obserwuje się coraz powszechniej występujące zjawisko niszczenia lub samoistnego zamierania pomnikowych dębów szypułkowych (*Quercus robur* L.), których wiek sięga kilkuset lat. W takiej sytuacji kluczowe jest zachowanie zasobów genowych, szczególnie w przypadku sędziwych drzew, które obok znaczenia kulturowego mają wiele cennych cech odporności na zmieniające się czynniki środowiskowe, ukształtowane na przestrzeni setek lat. Metoda wegetatywnego rozmnażania dębów tradycyjnymi technikami nie jest możliwa, ponieważ pędy dębów nie ukorzeniają się poprzez zrzezy czy odkłady, a szczepienie nie daje jednorodnej genetycznie rośliny z pędem i korzeniem. Dodatkowo proces ukorzenia się pędów jest szczególnie nieskuteczny w przypadku wiekowych dębów, dlatego niezbędne było sięgnięcie po techniki kultur tkankowych. W naszych badaniach testowaliśmy możliwość klonowania z wykorzystaniem metody *in vitro* 21 dębów pomnikowych z terenu Polski, w wieku 300–800 lat. Metoda ta polegała na pobraniu zdrewniałych pędów z pąkami śpiącymi, które następnie trzymano w hodowli wazonowej w fitotronie w celu uzyskania z nich pędów odrosłowych. Fragmenty tych pędów odkażono i namnożono na pożywce agarowej, zawierającej niezbędne składniki odżywcze oraz regulatory wzrostu. Wybrane z hodowli *in vitro* pędy ukorzeniono na pożywce z dodatkiem węgla aktywnego. Tylko kilka z badanych dębów pomnikowych wykazywało potencjał do mikrorozmnażania. Były wśród nich i te najstarsze z testowanych drzew. Ukorzenione pędy po zahartowaniu przeniesiono w podłoże stałe (Chmielarz et al., 2016). W ten sposób sklonowano około 800-letni dąb Rus z Rogalina i Dąb Wybickiego z Muzeum Hymnu Narodowego w Będominie, liczący około 400 lat. W kwietniu 2019 r. otrzymane sadzonki, o wysokości około 2 m, posadzono w niedalekiej odległości od drzew matecznych.

**ABSTRACT:** In recent years a decline of the oldest oaks (often monumental trees) aged up to several hundred years has been observed in Poland. That is why conservation of their genetic resources is crucial. The trees have many valuable traits of resistance to changing environmental factors, which allowed them to survive in a changing environment. Vegetative propagation of oaks by using traditional methods is not possible because they cannot be easily propagated by cuttings. The main goal of our research was to assess the potential of the oldest oaks growing in Poland for regeneration in plant tissue culture. Plant material was collected from 21 monumental oaks. Their lignified shoots were collected at the end of April and next adventitious shoots were induced from them in vase culture. The shoots, used as explants in tissue culture, were propagated and rooted.

As a result of this study, correctly growing plantlets (clones) were obtained under *ex vitro* conditions of several monumental oaks. Among them Rus Oak and The Wybicki Oak. There were no significant correlations between the age or trunk circumference at breast height of the maternal trees and the ability of their adventitious shoots to root *in vitro* culture, and the success rate of their acclimation.

Two cloned monumental trees, Rus Oak and The Wybicki Oak were planted as 2 m high seedlings respectively in Rogalin and Będomin, near their mother trees in April, 2019.

**Key words:** *Quercus robur*, micropropagation, old trees, shoots

## Wstęp

Zjawisko zamierania drzewostanów dębowych występuje w Europie już od wielu lat. Problem ten dotyczy także najstarszych dębów w Polsce, liczących 700–800 lat, objętych ochroną jako pomniki przyrody. Przykładem mogą być Dęby Rogalińskie: spośród trzech najstarszych, Czech jest już martwy, a w wypadku Lecha obserwuje się ciągły, pogarszający się stan zdrowia. Przyczyn tego upatruje się w zmianach klimatu, pogorszeniu się stosunków wodnych (Michałowicz, 1958; Przybył, 1989; Dąbrowski, Górski & Przybyłek, 1991), występowaniu szkodników owadzi (Pniewski, 1960), grzybów patogenicznych (Siwecki, 1989), a także niewłaściwych pracach konserwatorskich (Kasprzak & Kurzewski, 1995). Komosa i Roszyk (2006) w swych badaniach dowiedli także wpływu silnej degradacji gleby, skutkującej obniżeniem zasobności w mikro- i makroelementy. Ponadto stare drzewa, ponieważ mają ogromną, rozłożystą koronę, spękany i pusty pień, a jednocześnie bardzo małą masę korzeni w stosunku do części nadziemnej – łatwo się przewracają. Stare dęby narażone są w większym stopniu niż młodsze na akty wandalizmu. Nieznani sprawcy kilkakrotnie podpalali dąb Napoleon, który ostatecznie spłonął w 2010 r. Inny dostojny dąb pomnikowy Chrobry, z którego materiał zebraliśmy w 2013 r., padł ofiarą podpalaczy w następnym roku. W czerwcu tego roku (16/17.06.2019) podpalony został Mieszko I, najstarszy dąb w województwie mazowieckim, którego wiek jest szacowany mniej więcej na 600 lat.

## Zachowanie zasobów genowych starych drzew

Standardowe rozmnażanie wegetatywne starych drzew z fragmentów pędów jest bardzo trudne, a niemożliwe u bardzo starych dębów, o silnie obniżonym tempie wzrostu. Wykorzystaliśmy więc w naszych badaniach metodę hodowli *in vitro* dającą szansę na mikrorozmnożenie wegetatywne. Podjęte badania, obok walorów poznawczych, są też odpowiedzią na społeczną potrzebę zachowania sędziwych dębów.

Ochrona drzew pomnikowych, które pełnią ważną rolę w naturalnym ekosystemie, jest jedną z form zachowania różnorodności biologicznej. Największe drzewa rosnące w Amazonii osiągają wiek w granicach 400–1400 lat. W Ameryce Północnej sekwoja wieczniezielona (*Sequoia sempervirens*) żyje ponad 2000 lat, a wiek mamutowca olbrzymiego (*Sequoiadendron giganteum*) może przekroczyć 3000 lat (Laurance, 2012). Na terenie Hiszpanii stwierdzono obecność okazów oliwki europejskiej (*Olea europea*) osiągających wiek około 600 lat (Arnan et al., 2012). W Polsce za najstarsze drzewo uważa się cis rosnący w Henrykowie Lubuskim, w województwie dolnośląskim [na temat wieku tego drzewa traktuje inny artykuł w tym numerze – *przyp. red.*]. Z drzew liściastych grupę najstarszych drzew w Polsce tworzy dąb szypułkowy (*Quercus robur*). Wiek dębów pomnikowych określa się w przybliżeniu mniej więcej na 500–800 lat (Pacyniak, 2006; Ufnalski, dane niepubl.). Z punktu widzenia hodowli lasu stare drzewa mają często

wiele cennych cech (Neale & Kremer, 2011), a dla społeczeństwa przedstawiają wartość kulturową, naukową i historyczną.

## Hodowla *in vitro* dębów pomnikowych

Roślinne kultury tkankowe pozwalają na uzyskanie klonów poszczególnych osobników, dlatego mogą być wykorzystywane w odtwarzaniu cennych roślin, w tym drzew leśnych i parkowych. Dzięki opracowaniu kolejnych etapów hodowli *in vitro* oraz metod aklimatyzacji roślin do warunków *ex vitro* możliwa jest ich reintrodukcja do środowiska naturalnego (Reed et al., 2011).

W naszych badaniach materiałem do zapoczątkowania najpierw hodowli wazonowej, a następnie *in vitro*, były zdrewniałe pędy dębu szypułkowego, które pozyskano z 21 najokazalszych i najstarszych dębów o statusie drzew pomnikowych, rosnących na terenie dziewięciu województw (tab. 1, ryc. 1). Pierśnica drzew wynosiła od 470 do 1036 cm, a ich przybliżony wiek mieścił się w zakresie 300–800 lat. Wiek większości badanych drzew pomnikowych jest wartością przybliżoną (Pacyniak, 2006; Zarzyński & Tomusiak, 2014), określoną na podstawie ekstrapolacji danych o przyrostach rocznych i obwodzie pnia. Na podstawie badań dendrochronologicznych wykonanych w przez dr. Krzysztofa Ufnalskiego z Instytutu Dendrologii PAN określono przybliżony wiek Dębów Bąkowskich, Dębu Wybickiego oraz dębów: Bolesław, Dziadziuś, Rus i Warcisław.

Pierwszym krokiem w hodowli *in vitro* jest wybór eksplantatów roślinnych, z których zakłada się sterylną hodowlę. Ich rodzaj, wiek oraz potencjał do wzrostu są niezwykle istotne, ponieważ często warunkują powodzenie kolejnych etapów hodowli. Możliwe jest inicjowanie kultur tkankowych z pąków szczytowych lub kątowych, pędów, liści, fragmentów kwiatu, niedojrzałych zarodków zygocytynych oraz fragmentów hypokotyli lub liścieni. Kluczowym aspektem na tym etapie, warunkującym powodzenie hodowli, jest wybór eksplantatu jak najmłodszego, intensywnie rosnącego, będącego we wczesnych stadiach rozwojowych (Paunescu, 2009). W naszych badaniach nad dębem szypułkowym wykorzystano pędy odroślowe. Stwierdziliśmy, że dąb ten wytwarza takie pędy z pąków śpiących (podkorowych), usadowionych na zdrewniałych pędach. To właśnie pędy odroślowe, pocięte na niewielkie fragmenty z pozostawionymi pąkami kątowymi (liście odcinano) posłużyły do zapoczątkowania hodowli *in vitro*. Ażeby otrzymać pędy odroślowe, wykorzystaliśmy zdrewniałe pędy o długości około 1,5 m i średnicy 0,5–6,0 cm, które pocięto sekatorem na mniejsze fragmenty, długości 25–30 cm (ryc. 2).

Wzrost roślin w warunkach *in vitro* jest możliwy dzięki zastosowaniu odpowiednich pożywek, które są mieszaniną roztworów zawierających niezbędne makro i mikroelementy oraz inne dodatki takie jak: witaminy, aminokwasy, cukry (jako źródło energii) oraz regulatory wzrostu. W roku 1980 Lloyd i McCown stworzyli pożywkę WPM (Woody Plant Medium), która obecnie wykorzystywana jest w kulturach tkankowych roślin drzewiastych (McCown & Lloyd, 1981; Smith, 2013). W celu zestalenia pożywki dodaje się do niej zwykle agar (Thorpe, 2006) lub phytigel.

Tab. 1. Lokalizacja, przybliżony wiek oraz obwód pnia dębów pomnikowych, z których pozyskano zdrewniałe pędy  
 Tab. 1. Location, approximate age and perimeter of the trunk of monumental oaks, from which woody shoots were obtained

Nazwa (województwo)	Współrzędne geograficzne (°)	Wiek (lata)	Obwód pnia (cm)	Źródło
Bartek (świętokrzyskie)	N 50,9878 E 20,6501	680	985	Pacyniak, 2006
Dąb Bażyńskiego (warm.-mazurskie)	N 54,4919 E 19,5514	710	999	Pacyniak, 2006
Dąb Bąkowski 2 (kujaw.-pomorskie)	N 53,6289 E 18,8739	300	755	Ufnalski, dane niepubl.
Dąb Bąkowski 3 (kujaw.-pomorskie)	N 53,6289 E 18,8738	540	800	Ufnalski, dane niepubl.
Bolesław (zach.-pomorskie)	N 54,1810 E 15,6953	420	691	Ufnalski, dane niepubl.
Bolko (lubelskie)	N 51,2590 E 23,6994	650	859	Pacyniak, 2006
Chrobry (dolnośląskie)	N 51,5286 E 15,6965	760	997	Pacyniak, 2006
Chrześcijanin (podkarpackie)	N 50,0139 E 21,6131	650	1010	Pacyniak, 2006
Dziadziuś (wielkopolskie)	N 52,1630 E 17,1348	500	810	Ufnalski, dane niepubl.
Edward (wielkopolskie)	N 52,2359 E 16,9232	350	660	„Rejestr Polskich Drzew Pomnikowych”
Hoggo (warm.-mazurskie)	N 54,3225 E 19,5044	500	750	„Rejestr Polskich Drzew Pomnikowych”
Jan Kazimierz (kujaw.-pomorskie)	N 53,6289 E 18,8739	720	1036	Pacyniak, 2006
Lech (wielkopolskie)	N 52,2369 E 16,9260	530	664	Pacyniak, 2006
Mieszko I (mazowieckie)	N 52,2625 E 21,1278	620	855	Pacyniak, 2006
Dąb z Owińsk (wielkopolskie)	N 52,6587 E 17,0619	470	785	Pacyniak, 2006
Poganin (podkarpackie)	N 49,9047 E 21,9511	640	897	Pacyniak, 2006
Rus (wielkopolskie)	N 52,2370 E 16,9253	800	940	Ufnalski, dane niepubl.
Uparty Mazur (mazowieckie)	N 52,8556 E 20,5775	500	915	Zarzyński & Tomusiak, 2014
Warcisław (zach.-pomorskie)	N 54,1709 E 15,7063	640	720	Ufnalski, dane niepubl.
Dąb Prof. Władysława Szafera (kujaw.-pomorskie)	N 53,2200 E 17,9281	400	743	Zarzyński & Tomusiak, 2014
Dąb Wybickiego (kujaw.-pomorskie)	N 54,1295 E 18,1205	400	680	Ufnalski, dane niepubl.



Ryc. 1. Lokalizacja 21 dębów pomnikowych, z których zebrano materiał: 1 – Bartek, 2 – Dąb Bażyńskiego, 3 i 4 – Dęby Bąkowskie, 5 – Bolesław, 6 – Bolko, 7 – Chrobry, 8 – Chrześcijanin, 9 – Dziadzius, 10 – Edward, 11 – Hoggo, 12 – Jan Kazimierz, 13 – Lech, 14 – Mieszko I, 15 – Dąb z Owińsk, 16 – Poganin, 17 – Rus, 18 – Uparty Mazur, 19 – Warcisław, 20 – Dąb Prof. Władysława Szafera, 21 – Dąb Wybickiego

Fig. 1. Location of 21 monumental oaks, from which the material was collected: 1 – Bartek, 2 – The Bażyński Oak, 3 and 4 – Bąkowskie Oaks, 5 – Bolesław, 6 – Bolko, 7 – Chrobry, 8 – Chrześcijanin, 9 – Dziadzius, 10 – Edward, 11 – Hoggo, 12 – Jan Kazimierz, 13 – Lech, 14 – Mieszko I, 15 – Oak from Owińska, 16 – Poganin, 17 – Rus, 18 – Uparty Mazur, 19 – Warcisław, 20 – The Prof. Władysław Szafer Oak, 21 – The Wybicki Oak

Zapoczątkowanie sterylnych kultur *in vitro* wymaga eliminacji drobnoustrojów (zarodniki grzybów, bakterie) znajdujących się na powierzchni lub we wnętrzu eksplantatów. Duża ilość drobnoustrojów gromadzi się na powierzchniach pokrytych warstwą wosku (Smith, 2013). U wielu gatunków mikroorganizmy zasiedlają wiązki przewodzące i przestrzenie międzykomórkowe w mezofilu liścia, kalusie lub nasionach (Donnarumma et al., 2011; Miyazaki et al., 2011; Smith, 2013). Pierwszy etap hodowli pędów pochodzących z rośliny matecznej jest niezwykle trudny, ponieważ pojawia się wtedy największa liczba zakażeń. Dopiero po dwóch lub trzech miesiącach, wraz ze wzrostem nowych pędów i ich przeszczepianiem na świeżą pożywkę, zakażenia ustępują lub zdarzają się bardzo rzadko. Ponadto duże znaczenie dla zapoczątkowania sterylnych kultur ma pora roku pobierania eksplantatów. W przypadku naszych badań pędy odrosłowe otrzymaliśmy w hodowli wazonowej ze zdrewniałych pędów pobieranych z drzew wiosną.

Podczas optymalizacji odkażania eksplantatów powinno dążyć się do ustalenia możliwie jak najkrótszego czasu sterylizacji oraz użycia jak najniższego stężenia środka dezynfekującego, by minimalizować uszkodzenia żywej tkanki. Powszechnie stosowanymi związkami służącymi do odkażania są roztwory podchlorynu sodu, podchlorynu wapnia, alkoholu etylowego lub izopropylowego, perhydrolu, chlorku rtęci czy antybiotyki. W celu polepszenia ich działania stosuje się dodatek środków powierzchniowo czynnych, takich jak Tween-20 (Smith, 2013). W naszych badaniach zastosowano odpowiednio dobrane stężenie chlorku rtęci, po czym eksplantaty płukane były czterokrotnie w sterylnej wodzie. Po odkażeniu hodowano je na pożywce WPM z dodatkiem cytokininy BAP (6-benzylaminopuryna), aby pobudzić namnażanie pędów w kulturach *in vitro* (ryc. 3).

Pędy namnaża się cyklicznie w kolejnych comiesięcznych pasażach, a indukcja wzrostu korzeni z odpowiednich pędów, na pożywce z dodatkiem auksyny oraz węgla aktywnego, zamyka etap hodowli *in vitro*. Mikrosadzonki z pędem i korzeniem stopniowo się aklimatyzuje (hartuje) w trakcie przenoszenia do warunków *ex vitro*. Poddane są wtedy czynnikom stresowym, wynikającym głównie ze zmiany podłoża, znacznie obniżonej wilgotności powietrza, zróżnicowanej temperatury oraz intensywniejszego oświetlenia (Preece & Sutter, 1991; Chandra et al., 2010). Pominięcie tego istotnego etapu może być przyczyną dużej śmiertelności wśród wyhodowanych roślin (Dhawan & Bhojwani, 1986).

Wysoka wilgotność panująca w sterylnych naczyniach podczas długotrwałej hodowli *in vitro* prowadzi do wystąpienia zmian w obrębie aparatów szparkowych i, co za tym idzie, zwiększonej transpiracji. Dowiedziono, że w przypadku roślin hodowanych w warunkach *in vitro* aparaty szparkowe wykazują niezdolność do zamykania się, co może być przyczyną dużej utraty wody (Kumar & Rao, 2012). Ponadto zaobserwowano, że mają one inny kształt u roślin wyhodowanych w kulturach tkankowych w porównaniu z okazami rosnącymi w szklarni (l.c.).

Kolejna zmiana spowodowana przez hodowlę w warunkach *in vitro* dotyczy budowy anatomicznej liści. Organy te są cieńsze, mają słabo rozwiniętą warstwę miękiszu palisadowego, duże przestrzenie powietrzne w mezofilu oraz mniej wiązek przewodzących (Kumar & Rao, 2012). W trakcie aklimatyzacji budowa liści zwykle się nie zmienia. Dopiero nowo wykształcone organy charakteryzują się większą grubością z powodu bardziej rozwiniętej warstwy miękiszu palisadowego. Ponadto hodowla w kulturach *in vitro* zaburza syntezę wosków intra- i epikutylarnych, których intensywne wytwarzanie zachodzi dopiero podczas procesu aklimatyzacji. W konsekwencji podczas stopniowej



Ryc. 2. Hodowla wazonowa pędów odrosłowych dębu szypułkowego: fragmenty zdrewniałych pędów (po lewej), hodowla wazonowa pędów w wilgotnym powietrzu na świetle (środek), pędy odrosłowe (po prawej)

Fig. 2. Vase culture of shoots of pedunculate oak: fragments of woody shoots (left), vase cultivation of shoots in moist air on light (centre), basal (adventitious) shoots (right)

aklimatyzacji zaczyna zmniejszać się transpiracja kutykularna oraz prawidłowo działa regulacja gospodarki wodnej za sprawą funkcjonujących aparatów szparkowych (Fila et al., 1998; Kumar & Rao, 2012).

Intensywne nasłonecznienie roślin pochodzących z kultur tkankowych powoduje fotoinhibicję i może doprowadzić do uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego (Kumar & Rao, 2012). Kolejnym ważnym aspektem podczas aklimatyzacji jest zmiana strategii odżywiania z miksotroficznej (w środowisku pożywki agarowej o zwiększonej ilości związków organicznych w podłożu) na autotroficzną, kiedy rośliny mają ich mniej do dyspozycji.

Skuteczny proces aklimatyzacji musi przebiegać stopniowo przez odpowiednio długi czas, co pozwala mikrosadzonkom dostosować się do naturalnych warunków atmosferycznych i cofnąć zmiany spowodowane hodowlą w warunkach *in vitro* (Pospóšilová et al., 1999). W przypadku dębów dobrze ukorzenione rośliny z hodowli *in vitro*, które osiągnęły długość pędu około 8 cm, a korzenia 10–25 cm, wysadzano do wysokich pojemników w podłoże stałe. Sadzonki umieszczono w temperaturze zbliżonej do tej, jaka panowała w warunkach *in vitro*, czyli około 25°C, na świetle i w wysokiej wilgotności powietrza, którą następnie stopniowo redukowano.

### Niektóre aspekty hodowli *in vitro* dębów pomnikowych

Inicjacja kultur tkankowych roślin drzewiastych w porównaniu z roślinami zielnymi stwarza znacznie więcej problemów metodycznych, a sama hodowla *in vitro* jest tym trudniejsza, im starsze są drzewa, z których pobierany jest materiał (Rathore et al., 2004). Dzieje się tak, ponieważ w wyniku starzenia się organizmu zmniejsza się tempo wzrostu pędów oraz możliwość ich ukorzenienia (Haffner et al., 1991). Jednak, co bardzo interesujące, można cofnąć ten proces. Przypuszczalnie istnieje ścisły związek starzenia się roślin i regulacji epigenetycznych (Smulders & Klerk, 2011). Zmiana w ekspresji genów może warunkować wiele cech, na przykład kompetencję poszczególnych komórek do podziałów i różnicowania, dlatego niezwykle ważny dla mikropropagacji starych drzew jest aspekt rejuwenalizacji, czyli odmładzania. Jedną z metod, jaką zastosowaliśmy w naszych badaniach nad dębami pomnikowymi, była właśnie indukcja wzrostu pędów odrosłowych



Ryc. 3. Odkażanie eksplantatów oraz inicjacja wzrostu pędów w hodowli *in vitro*

Fig. 3. Disinfection of explants and initiation of shoot growth in *in vitro* culture

(przyszłych eksplantatów) z pąków śpiących zdrewniałych pędów (ryc. 2).

W naszych badaniach obok głównego celu, sklonowania 800-letnich dębów metodą *in vitro*, staraliśmy się odpowiedzieć na pytanie: od czego zależy przeżywalność pędów w pierwszym miesiącu hodowli *in vitro*: od wieku tych sędziwych dębów czy w większym stopniu od ich indywidualnego genotypu? Tę część badań przeprowadzono w ramach pracy doktorskiej dr. Szymona Kotlarskiego, a wyniki tych doświadczeń poddano analizie statystycznej. Efekt badań był w pewnym stopniu zaskoczeniem, ponieważ pokazały, że przeżywalność pędów w pierwszym miesiącu hodowli *in vitro* zależna była od genotypu drzewa matecznego. Natomiast nie stwierdzono zależności między efektywnością późniejszego namnażania pędów w hodowli *in vitro* i pierśnicą drzew, z których pobierano materiał wyjściowy. Wskazywałoby to na brak ścisłej korelacji z wiekiem drzew, przynajmniej dla tych najstarszych 500–800-letnich. W tym miejscu trzeba zauważyć, że przy określaniu wieku należy mieć na względzie niepewność związaną z tym, że bardzo wiekowe drzewa mają pień pusty w środku. Choć brak najstarszych słojuw utrudnia precyzyjne wyznaczenie wieku, to jednak metoda dendrometryczna pozwala określić go z dokładnością do 50 lat (Ufnalski, dane niepubl.).

Weryfikując nasze hipotezy badawcze, stwierdziliśmy, że nie wszystkie wiekowe dęby pomnikowe można

było rozmnożyć z wykorzystaniem metody *in vitro*. Metoda pozwoliła rozmnożyć (kompletna sadzonka z pędem i korzeniem) zaledwie osiem z testowanych 21 dębów pomnikowych, w tym jeden z najstarszych w Polsce dąb Rus z Rogalina. Podczas samej hodowli *in vitro* oraz bardzo trudnego etapu aklimatyzacji i przenoszenia roślin do warunków *ex vitro* traciliśmy dużą część wyhodowanych sadzonek. Chcemy poprawić ten etap w całościowym ujęciu klonowania dębów pomnikowych.

Ostatecznie w 2019 r. pierwsze, otrzymane metodą *in vitro* klony dwóch dębów pomnikowych wysadzono w miejscu docelowym w gruncie. Była to czteroletnia sadzonka dębu Rus (dwa lata *in vitro* + dwa lata *ex vitro* w pojemniku) o wysokości około dwóch metrów, posadzona w Rogalinie 12 kwietnia 2019 r., i klon Dębu Wybickiego podobnej wielkości, który posadzono niedaleko drzewa matecznego przy Muzeum Hymnu Narodowego w Będminie 26 kwietnia (ryc. 4–6).

Metodę klonowania opracowano przy zaangażowaniu pracowników technicznych Pracowni Biologii Rozmnażania i Genetyki Populacyjnej (Magdalena Sobczak, Paulina Pilarz, Agat Obarska i Danuta Szymańska) pod kierunkiem dr. hab. Pawła Chmielarza, prof. ID PAN, oraz współpracy z Dymitrijem Kulaginem z Instytutu Lasu w Homlu na Białorusi. Badania były współfinansowane ze środków Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych w Warszawie (numer projektu: EO-2717-4/13).



Ryc. 4. Wspólna fotografia przy dębie Rus, liczącym około 800 lat i sklonowanym potomku (na wózku), podczas seminarium poświęconemu ochronie zasobów genowych dębów pomnikowych w Polsce, Rogalin, 12.04.2019 r.

Fig. 4. A joint photograph near the Rus Oak, approximately 800 years old and its cloned descendant (on a trolley), during a seminar dedicated to the Protection of Genetic Resources of Monument Oaks in Poland, Rogalin, 12.04.2019



Ryc. 5. Sklonowany dąb Rus posadzono przy głównym wejściu do Muzeum Pałacu w Rogalinie, dr Szymon Kotlarski (sadzi dąb) – autor pracy doktorskiej pt. „Ocena możliwości zachowania zasobów genowych najstarszych dębów (*Quercus robur* L.) w Polsce przez klonowanie *in vitro* oraz kriokonserwację”, od lewej: Burmistrz Gminy Mosina – Przemysław Mieloch, Dyrektor Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu – Tomasz Markiewicz, prof. dr hab. Andrzej Grzywacz (SGGW w Warszawie) i dr hab. Paweł Chmielarz (ID PAN w Kórniku)

Fig. 5. Cloned Rus Oak was planted at the main entrance to the Museum and Park complex in Rogalin – the Branch of the National Museum in Poznań, dr. Szymon Kotlarski (plants the oak) – author of the doctoral dissertation *Assessment of the possibility of preserving the genetic resources of the oldest oaks (Quercus robur L.) in Poland by in vitro cloning and cryopreservation*, from the left: Mayor of Mosina – Przemysław Mieloch, Director of the Regional Directorate of State Forests in Poznań – Tomasz Markiewicz, prof. dr hab. Andrzej Grzywacz (Warsaw University of Life Sciences WULS – SGGW) and assoc. prof. Paweł Chmielarz (Institute of Dendrology, Polish Academy of Sciences)



Ryc. 6. Sklonowany Dąb Wybickiego posadzono obok drzewa macierzystego (liczącego około 400 lat), na terenie Muzeum Hymnu Narodowego w Będominie, 26.04.2019 r.; przy dębie P. Chmielarz

Fig. 6. The Wybicki Oak (cloned) was planted next to the parent tree (about 400 years old) in the National Anthem Museum in Będomin, 26.04.2019; P. Chmielarz (beside the oak)

## Literatura

- Arnan X, López BC, Martínez-Vilalta J, Estorach M, Poyatos R. 2012. The age of monumental olive trees (*Olea europaea*) in northeastern Spain. *Dendrochronologia* 30:11–14.
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32:1199–1205.
- Chmielarz P, Kotlarski S, Tylkowski T, Michalak M. 2016. Czy można sklonować najstarsze dęby pomnikowe? W: Tomaszewski D, Jagodziński AM red. *Drzewa i lasy w zmieniającym się środowisku. Konferencja naukowa Kórnik–Poznań, 17–19 października 2016. Materiały konferencyjne*. Poznań: Bogucki Wydawnictwo Naukowe, 245–247.
- Dąbrowski S, Górski J, Przybyłek J. 1991. Wśród Dębów Rogalińskich wokół pałacu i na łągach nadwarciańskich. W: Lorenc S, Wojewoda J red. *Przewodnik LXII Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Geologicznego: Poznań, 5–7 września 1991*. Poznań: Instytut Geologii UAM w Poznaniu, 67.
- Dhawan V, Bhojwani SS. 1986. Micropropagation in crop plants. *Glimpses in Plant Research* 7:1–75.
- Donnarumma F, Capuana M, Vettori C, Petrini G, Gianini R, Indorato C, Mastromei G. 2011. Isolation and characterisation of bacterial colonies from seeds and in vitro cultures of *Fraxinus* spp. from Italian sites. *Plant Biology* 13:169–176.
- Fila G, Ghashghaie J, Hoarau J, Cornic G. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiologia Plantarum* 102:411–418.
- Haffner V, Enjalric F, Lardet L, Carron MP. 1991. Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. *Annals of Forest Science* 48:615–630.
- Kasprzak K, Kurzewski R. 1995. Ochrona dębów rogalińskich. *Kronika Wielkopolski* 4:5–14.
- Komosa A, Roszyk J. 2006. Przyczyny i zapobieganie zamieraniu Dębów Rogalińskich. *Acta Agrophysica* 7:937–946.
- Kumar K, Rao IU. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in-ex vitro conditions—a reviews. *Journal of Ornamental Horticultural Plants* 2:271–283.
- Laurance W. 2012. Big trees: how the mighty are falling. *New Scientist* 213:39–41.
- Mccown BH, Lloyd G. 1981. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 16:453–453.
- Michałowicz A. 1958. Dęby w Rogalinie giną. *Wszechświat* 6:160–161.
- Miyazaki J, Errington SG, Kuo JJS. 2011. *Macropidia fuliginosa*: its localization and eradication from in vitro cultured basal stem cells. *Australian Journal of Botany* 59:363–368.
- Neale DB, Kremer A. 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12:111–122.
- Pacyniak C. 2006. Wiek najstarszych i niektórych pomnikowych dębów w Polsce. W: Bugała W red. *Dęby*. Poznań–Kórnik: Bogucki Wydawnictwo Naukowe, 850–876.
- Paunescu A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnology Letters* 14:4095–4103.
- Pniewski Z. 1960. Tragedia rogalińskich dębów. *Przyroda Polski Zachodniej* 1–4:146–149.
- Pospóšilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzánková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 42:481–497.
- Preece JE, Sutter EG. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. W: Debergh PC, Zimmerman RH red. *Micropropagation*. Dordrecht: Springer, 71–93.
- Przybył K. 1989. Wpływ warunków klimatycznych na zamieranie dębów w Polsce oraz symptomy choroby. *Arboretum Kórnickie* 34:143–160.
- Rathore JS, Rathore V, Shekhawat NS, Singh RP, Liler G, Phulwaria M, Dagla HR. 2004. Micropropagation of woody plants. W: Srivastava PS, Narula A, Srivastava S red. *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Dordrecht: Springer, 195–205.
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E, Pence VC. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 47:1–4.
- Rejestr Polskich Drzew Pomnikowych. Na stronie: <https://www.rpdp.hostingasp.pl/> (dostęp: 1.10.2017)
- Siwecki R. 1989. A decline of oak forests caused by abiotic and biotic factors and attempts at biological research in this syndrome. *Arboretum Kórnickie* 34:161–169.
- Smith RH. 2013. *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. San Diego: Academic Press.
- Smulders MJM, Klerk GJ. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 63:137–146.
- Thorpe T. 2006. *History of plant tissue culture*. W: Loyola-Vargas V, Vázquez-Flota F red. *Plant Cell Culture Protocols*. New Jersey: Humana Press, 9–32.
- Zarzyński P, Tomusiak R. 2014. *90 Drzew. Okazy niezwykle*. Warszawa: Centrum Informacyjne Lasów Państwowych.