



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



*„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”*

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Mikropropagacja Roślin



Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski
2012



Grudnik

Shlumbergera truncate Moran, (zygokaktus, grudnik, Christmas plant) należy do rodziny kaktusowatych. Roślina ta jest epifitem rosnącym na drzewach w brazylijskich lasach deszczowych, do Europy został sprowadzony w 1918 roku.



Fot.1. Roślina *Shlumbergera truncate*.

Najprościej roślinę tą rozmnaża się poprzez ukorzenianie fragmentów pędów. Proces ukorzeniania można przeprowadzać bezpośrednio w ziemi ale jest on mało wydajny i trwa stosunkowo długo. Znacznie szybciej roślinę można ukorzenić w kulturze *in vitro*.

Eksplantatami są fragmenty łodygi pochodzące z roślin rosnących w ziemi. Fragmenty te sterylizujemy wstępnie 70% alkoholem etylowym, właściwą sterylizację przeprowadzamy w 20% roztworze wodnym ACE przez 20 minut. Wysterylizowane eksplantaty płuczemy trzykrotnie w sterylnej wodzie.

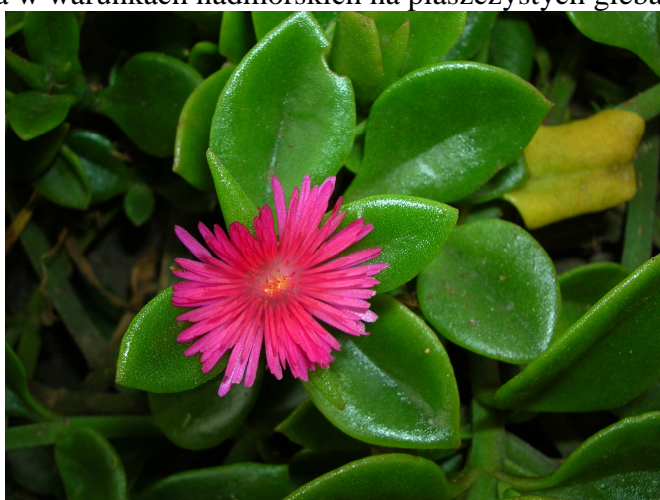
Sterylny materiał umieszczamy w pozycji wertykalnej na pożywce: ½ MS z dodatkiem 20g sacharozy, 1mg/L NAA, 6 g/L agaru, pH 5,8. Przygotowaną pożywkę rozlewamy do kolbek o pojemności 50ml. W kolbce umieszczamy po jednym fragmencie łodygi. Po okresie 2-3 tygodni ukorzenione fragmenty roślin przesadzamy do doniczek zawierających mieszankę ziemi z wermikulitem w proporcjach 50% ziemi, 50% wermikulitu (uwodniony glinokrzemian magnezu, żelaza i litu - używany w ogrodnictwie jako środek spulchniający ziemię).



Fot. 2. Eksplantaty pędowe zygokaktusa.



Aptenia cordifolia (ice plant, baby Sun rose). Roślina ta pochodzi z wschodniego wybrzeża południowej Afryki. Jest wiecznie zielonym sukulentem odpornym na suszę. W basenie morza śródziemnego rośnie przez cały rok w Polsce tylko sezonowo lub jako roślina doniczkowa w zamkniętych pomieszczeniach. W Europie traktowana jest jako roślina ozdobna. Zulusi wykorzystują ją jako ochronę przed czarami jak również w celach leczniczych. Wyciąg z niej ma właściwości przeciwzapalne a palone w fajkach suche pędy używane są jako środek przeciw bólowy. Roślina ta może być wykorzystywana także do odsalania gleby gdyż gromadzi ona sól w swoich liściach, jest idealna jako roślina okrywowa rosnąca w warunkach nadmorskich na piaszczystych glebach.



Fot 3. Roślina *Aptenia cordifolia*.

Rozmnażać można ją wegetatywnie przez sadzonkowanie oraz bardziej wydajnie w kulturze *in vitro*. Eksplantatami będą fragmenty łodyg zawierające merystemy kątowe liści. Z pobranych pędów usuwamy liście, tnijemy je na fragmenty o długości 3-4cm, wstępnie sterylizujemy 70% alkoholem etylowym a następnie sterylizujemy je w 20% ACE przez 20 minut. Wysterylizowane łodygi płuczemy trzykrotnie w wodzie sterylnej usuwamy części łodygi nie zawierające merystemów kątowych i fragmenty o długości ~1cm umieszczamy horyzontalnie na pożywce.

Pożywka indukująca pędy i korzenie przygotowujemy na bazie pożywki MS z dodatkiem 30g sacharozy, 1mg/L NAA, 1mg/L BAP i 100mg/L inozytolu, 6g/L agaru pH 5,8. Pożywkę rozlewamy na szalki Petriego o średnicy 5cm. Po okresie około 3 tygodni powinny powstać pędy oraz korzenie. Jeśli pędy są zbyt małe a korzenie nie wystarczająco rozwinięte to po 4 tygodniach przeprowadzamy pasaż na pożywkę o tym samym składzie. Otrzymane rośliny przenosimy do doniczek zawierających mieszankę ziemi ogrodniczej z wermikulitem w proporcjach pół na pół.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>



Fot. 4. Merystemy kątowe liści



Fot. 4. Regeneracja pędów z merystemów kątowych

Skrętnik

Streptocarpus hybridus (skrętnik). Do rodzaju tego zaliczamy ponad 150 gatunków roślin rosnących w południowej Afryce i na Madagaskarze. Nazwa tego rodzaju - *Streptocarpus* - pochodzi od charakterystycznie skręconych wrzecionowatych nasion jest on blisko spokrewniony z roślinami z rodzaju *Sainpoulia*. Obecnie w celach ozdobnych najczęściej hodowane są mieszańce międzygatunkowe. W naturalnych warunkach często porasta on brzegi klifowe. Po raz pierwszy do Europy został sprowadzony 1826 roku gdzie zaczęto go hodować w botanicznym ogrodzie w Kew, Anglia.



Fot. 5. Nasiona skrętnika



Fot. 6. Rośliny *Streptocarpus hybridus*.



Rośliny te można rozmnażać przez nasiona jak również wegetatywnie. Ten pierwszy sposób jest rzadko stosowany gdyż są to najczęściej mieszance, których cechy przy tym typie rozmnażania segregują dając niejednorodne potomstwo. Najefektywniej jest on rozmnażany w kulturach *in vitro*. Jako eksplantaty wykorzystujemy fragmenty liści. Trudność w zastosowaniu tej metody polega na tym, że liście tej rośliny są bardzo wrażliwe na środki sterylizujące i często zamierają. Dlatego najlepiej jest wykorzystać fragmenty liści pochodzące z sterylnej kultury.

Po 4 tygodniach w procesie bezpośredniej organogenezy tworzone są rośliny. Pożywkę indukującą powstawanie siewek przygotowujemy na bazie MS z dodatkiem 25g sacharozy/L, 1mg NAA/L, 1mg IAA/L i 150mg/L inozytolu, 6g/L agaru pH 5,8, którą rozlewamy na płytki Petriego o średnicy 5cm.

Otrzymane w ten sposób siewki ukorzeniamy na pożywce przygotowanej na bazie ½ MS z dodatkiem 20g/L sacharozy, 0,5mg NAA/L oraz 2 g/L węgla aktywnego. Ukorzenione rośliny przenosimy do doniczek zawierających mieszankę ziemi z wermikulitem w proporcjach pół na pół.

Begonia

Gatunki należące do rodzaju *Begonia* występują w rejonach tropikalnych i subtropikalnych centralnej oraz południowej Ameryki, Azji i Afryki. Obecnie znanych jest ponad 2000 tysięcy gatunków należących do tego rodzaju są to przeważnie rośliny wieloletnie zawierające grube korzenie oraz bulwy. Begonie to ważne ozdobne rośliny hodowane zarówno w ogrodach jak wewnątrz domów. Rośliny te stosunkowo łatwo rozmnaża się wegetatywnie najczęściej poprzez fragmenty liście. Jednakże aby uzyskać zdrowe jednorodne rośliny najlepiej jest je rozmnażać w kulturach *in vitro*.



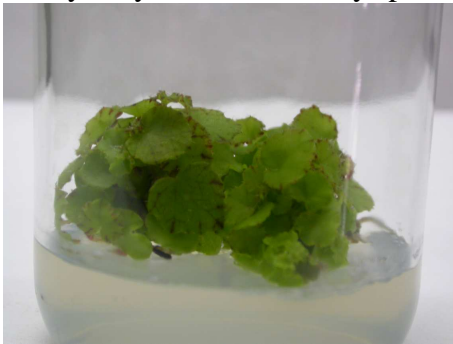
Fot 7. Liście różnych odmian begonii.

Begonia rex (begonia) Jako eksplantaty można wykorzystać wszystkie części tej rośliny. Najczęściej używa się fragmentów blaszki liściowej lub ogonka liścia. Również dobre rezultaty otrzymuje się z eksplantatów pochodzących pędów lub kwiatostanów. W celu



ograniczenia ewentualnych zakażeń podczas hodowli w warunkach *in vitro*, wykorzystywać będziemy eksplantaty liściowe pochodzące z sterylnej kultury. Liście oraz ogonki liściowe tniemy na fragmenty o długości 5mm i szerokości 3mm. Regeneracyjną pożywkę przygotowujemy na bazie pożywki MS z dodatkiem 25g/L sacharozy, 0,2mg/L NAA, 0,2mg/L BAP oraz 100mg/L inozytolu, pH 5,8. Otrzymane tą drogą rośliny jeśli nie posiadają dostatecznie rozwiniętego systemu korzeniowego przenosimy na pożywkę o składzie 1/2MS, 15g sacharozy, bez

hormonów. Pożywkę rozlewamy na szalki Petriego o średnicy 5cm. Eksplantaty liściowe umieszczamy horyzontalnie tak aby spodnia strona liścia stykała się z pożywką.



Fot.8. Zregenerowane w rośliny begonii.

Coleous

Rodzaj *Coleus* zawiera ponad 300 gatunków roślin, zaliczanych do rodziny *Lamiaceae*. Rośliny te pochodzą z regionów tropikalnych i subtropikalnych Afryki, Australii, wschodnich Indii a także z archipelagu filipińskiego. W Indiach *C. tuberosus* jest używana jako warzywo jak również ma on liczne zastosowania w medycynie jako środek przeciwko chorobom skóry, układu krążenia, płuc oraz przeciw pasożytom. Nazwa rodzajowa pochodzi z greckiego słowa koleos, które oznacza otoczkę pochwę. Gatunki należące do tego rodzaju mogą być jednorocznymi roślinami bądź wieloletnimi krzewami.



Fot. 8. Roślina *Coleus blumei*.

C. blumei (koleus, pokrzywka) jest gatunkiem występującym w południowo-wschodniej Azji. Jego przynależność systematyczna nie jest jasna. Tworzy on naturalne hybrydy i często ta nazwą



określane są różne gatunki. Gatunek ten po raz pierwszy opisał Lineusz 1763. Pierwsze rośliny zostały sprowadzone do Europy w 1851 z Jawy. Rośliny te zawierają kwas rozmarynowy ale są głównie wykorzystywane w celach ozdobnych. Ten wtórny metabolit zabezpiecza rośliny przed chorobami grzybowymi, bakteriami oraz wirusami. Jako roślina lecznicza jest wykorzystywany w Indiach, Indonezji i Meksyku. Kwas rozmarynowy jest także silnym antyoksydantem występującym w wielu gatunkach roślin w lecznictwie stosowany jest od ponad 2 000 lat.

Rośliny te najłatwiej jest rozmnażać przez nasiona. Ponieważ najczęściej są to mieszańce to ich cechy podczas rozmnażania generatywnego segregują dlatego aby uzyskać jednorodny materiał konieczne jest rozmnażanie wegetatywne. Jako eksplantaty wykorzystamy fragmenty łodyg zawierające merystemy kątowe liści. Łodygi sterylizujemy wstępnie w 70% alkoholu etylowym a następnie przez 25 minut w 20% ACE. Wysterylizowane fragmenty łodyg tnijemy na 2cm kawałki i umieszczamy horyzontalnie na pożywce. Pożywkę przygotowujemy na bazie MS z dodatkiem 25g sacharozy, 0,5mg/L BAP, 1 mg/L NAA, 100mg inozytolu, 6g/L agaru, pH 5,8. Otrzymane w ten sposób rośliny przenosimy do doniczek zawierających mieszankę ziemi z wermikulitem w proporcjach 50 na 50%.



Fot. 9. Zregenerowane rośliny koleusa.

Chryzantema

Dendrantema grandiflora (chryzantema, outumn queen) jest jedna z trzech najważniejszych ciętych i doniczkowych roślin uprawianych na świecie. Pochodzi z Chin, gdzie była już hodowana 2500 lat temu. Chryzantema ogrodowa jest heksaploidem ($2n=6x=54$). Roślinę tą można rozmnażać poprzez odrosty korzeniowe lub sadzonkowanie pędów. Metody te są mało wydajne i rzadko stosowane. Już w latach 50 ubiegłego wieku opracowano pierwsze protokoły pozwalające na rozmnażanie tej rośliny w kulturach *in vitro*. Obecnie istnieje cały szereg metod umożliwiających klonowanie tej rośliny.

Najbardziej wydajna jest opracowana 30 lat temu metoda TCL (Thin cell layers) czyli hodowla cienkich skrawków komórkowych. Metodę tą stosuje się u wielu gatunków roślin mających duże znaczenie ekonomiczne. O wydajności tej metody niech świadczy przykład zastosowanie jej w mikropropagacji fiołka afrykańskiego (*Saintpoulia ionantha*) gdzie z jednego liścia tej rośliny po 3 miesiącach otrzymano 70 000 nowych roślin.

Podobne rezultaty można uzyskać stosując ją w mikropropagacji chryzantem. Eksplantatami będą w tym doświadczeniu liście i pędy pochodzące z sterylnej kultury oraz dla porównania pędy roślin rosnących w ziemi. Sterylne eksplantaty tnijemy na kawałki o grubości 1mm (łodyga) i 2mm² (liść). Łodygi pochodzące z nie sterylnych roślin tnijemy na odcinki 3cm sterylizujemy podobnie jak w poprzednich eksperymentach. Po sterylizacji



obcinamy obydwie końce łodyg gdyż zawierają one martwe tkanki a następnie tnemy je na odcinki o grubości 1-1,5mm.

Eksplantaty (po 5 fragmentów) umieszczamy na szalkach Petriego o średnicy 5cm zawierających pożywkę MS z dodatkiem 25g/L sacharozy, 2mg/L BAP, 0,5/L NAA, 100mg/L inozytolu zestalonej agarą (6g/L) pH5,8. Otrzymane w ten sposób rośliny odcinamy od kalusującego eksplantatu i przenosimy na pożywkę ukorzeniającą, 1/2MS z dodatkiem 1mg/L NAA. Po dwóch tygodniach ukorzenione rośliny sadzimy w mieszance ziemi z wermikulitem proporcjach 50 na 50%.



Fot. 10. Eksplantaty pędowe chryzantemy

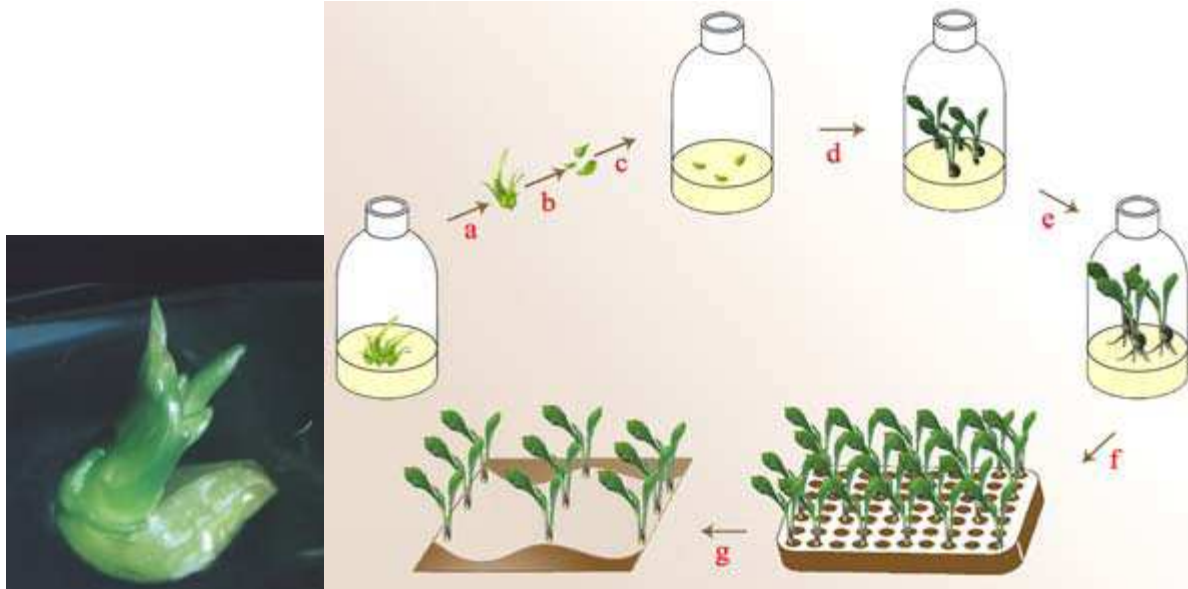
Fot. 11. Regenerujące rośliny chryzantemy

Fot. 12. Rośliny chryzantemy pochodzące z kultur *In vitro*

Lilia

Lilium spp. (Lilia, lily) Rodzaj ten jest jednym z 220 należących do rodziny Liliaceae. Reprezentowany jest przez 85 gatunków, z których większość wykorzystywana jest jako rośliny ozdobne. O ich znaczeniu niech świadczy fakt, że 24% światowego obrotu kwiatami stanowią trzy grupy roślin cebulowych: lilie, tulipany i frezje. Obecnie wiele odmian to mieszańce międzygatunkowe otrzymywane przez krzyżowanie oraz hodowlę mieszańcowych zarodków w kulturach *in vitro*. Otrzymane w ten sposób rośliny są najczęściej niepłodne, dlatego też jedynie można je rozmnażać wegetatywnie. Tradycyjna metoda polega na namnażaniu cebul w ziemi co jest procesem bardzo wolnym i mało wydajnym ponadto często otrzymane tą drogą cebulki są zainfekowane przez grzyby. Najlepsze rezultaty uzyskuje się w kulturze *in vitro*.

Jako eksplantaty wykorzystuje się wszystkie części rośliny. Obecnie istnieje wiele protokołów umożliwiających mikropropagację tych roślin. Najwięcej roślin otrzymuje się z eksplantatów cebulowych lub pochodzących z kultury *in vitro* pseudo cebulek.



Fot.13. Pseudo cebulki *Lilium multiflorum*.

Ryc. 1. Schemat regeneracji lilii w oaparciu o eksplantaty pochodzące z pseudo cebulek.

W eksperymencie tym jako eksplantaty wykorzystane zostaną pseudo cebulki oraz liście pochodzące z kultur *in vitro*. Pseudo cebulki po izolacji umieszczamy na pożywce MS zawierającej 2mg/L NAA oraz 1,5mg/L BAP, 30g/L sacharozy, 6g/L agaru, 100mg/mioinozytol, ph 5,8. Pożywkę rozlewamy do kolbek o pojemności 50ml. Odcięte z pseudo cebulek liście tnjemy na kawałki o długości 0,5cm i umieszczamy na pożywce o składzie jak wyżej oraz na pożywce MS indukującej embriogenezę o składzie 3mg/L 2,4-D, 0,25mg/L BAP, 30 g/L sacharozy, 100mg/L inozytolu, 6g/L agaru, ph 5,8. Pożywkę na eksplantaty liściowe rozlewamy na szalki Petriego o średnicy 5cm. Indukcja embriogenezy ma przebiegać w ciemności. Otrzymane w ten sposób rośliny ukorzeniamy na pożywce ½ MS zawierającej 0,25NAA pozostałe komponenty jak wyżej.

Rosiczka





Rosiczka (*Drosera L.*) –rodzaj obejmuje ok 150 gatunków roślin owadożernych,, występuje na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy. Wiele gatunków znanych jest z południa Afryki, z Australii i Ameryki Południowej. Gatunkiem typowym jest *Drosera rotundifolia*L.

Rosiczki rosną na różnych glebach, w większości kwaśnych, piaszczystych, kamienistych i bagiennych. Owadożerność rekompensuje braki składników odżywczych w ubogich glebach – w szczególności przyswajalnego azotu. Wabią swoje ofiary błyszczącymi kroplami słodkiej cieczy, które są wydzielane na szczytach – czulkach porastających powierzchnie liści. Dzięki zawartości barwników antocyjanowych mają one czerwony kolor zwiększający ich atrakcyjność.

Rosiczka jako roślina owadożerna działa aktywnie. Ofiara wchodzi na liść i lepka substancja ją unieruchamia. Powoli pułapka się zamyka. Trwa to około 3 godzin. Wydzielany kwask mrówkowy zaczyna rozpuszczać ciało owada. Uwalniają się dzięki temu cząsteczki białka. To powoduje wydzielenie enzymów proteolitycznych. Miękkie części ciała ofiary zostają strawione, a powstała z nich ciecz – bogata w substancje odżywcze, ulega wchłonięciu przez roślinę. Po strawieniu ofiary liść otwiera się, a pozostałości zwykle są zdmuchiwane przez wiatr. Ponowne otwarcie następuje po 24 godzinach.

Roślina objęta w Polsce ściśle ochroną gatunkową. Ochronę rosiczek wprowadzono już w 1946 r. Liczebność populacji stopniowo zmniejsza się. W opracowaniu Czerwona lista roślin i grzybów Polski jest umieszczona w grupie gatunków zagrożonych wyginięciem (kategoria zagrożenia V) Roślina lecznicza: zawiera glikozydy (droseron, plumbagina), cholinę, związki cyjanogenne. Ma działanie: przeciwbólowe.

- Dawniej z rosiczki robiono nalewkę, zwaną rosa lisami (od *ros solis*– rosa słoneczna). Nalewki używano w stanach gorączkowych oraz przy dolegliwościach kobiecych. Płukanki z ziela rosiczki miały skutecznie uśmierzać ból zębów. Rosiczkowe napary stosowano jako lek przynoszący ulgę przy bólach oczu, głowy, żołądka, serca.
- Niegdyś używano jej suszonych kwiatów jako zamiennika tytoniu.
- Rosiczkę wykorzystywano do odstraszenia złych duchów i jako zabezpieczenie przed nieprzychylnymi czarami. W tym celu wianki z rosiczki zakopywano w oborze i w mieszkalnych izbach.

Rosiczki można rozmnażać przez nasiona. Jednakże w celach komercyjnych rośliny te najlepiej namnażać jest w kulturach *In vitro*. Metoda ta umożliwia produkcję metabolitów wtórnych wytwarzanych przez ta roślinę. Jako eksplantaty najlepiej nadają się pędy kwiatowe oraz kwiatostany, gdyż liście są zbyt delikatne i giną podczas sterylizacji. Jeśli dysponujemy sterylnym materiałem pochodzącym z kultur *In vitro* to także liście mogą być wykorzystane jako eksplantaty. Jako pożywkę do inicjacji kultury możemy użyć pożywki MS przy czym jej koncentracja nie powinna przekraczać 50% podobnie jest z stężeniem cukru, którego koncentracja to 12g/L. pH ustalamy na poziomie 5,5. Pożywkę zestalamy agarom w stężeniu 6g/L. Jedynym regulatorem wzrostu jest zeatyna w koncentracji 0,5mg/L. Po 3 tygodniach różnicujące eksplantaty przenosimy na pożywkę płynną o tym samym składzie(bez agaru). Rośliny na tej pożywce wytwarzają liczne pędy oraz korzenie.



Bibliografia:

- Bhattacharya, P., Dey, S., N. Das and Ch. Bhattacharya. 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. Plant Cell Report 9: 439-442
- Burrit, J. D. and D. W. M. Leung. 2003 Adventitious shoot regeneration from *Begonia x erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. Physiology Plantarum 118: 289-296
- Kapoor, R., S. Kumar, J. K. Kanwar and P. K. Mahajan. 2008. In vitro bulblet productivity in different explants of hybrid lilies. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol 16: 345-352
- Karim, M. Z., A. Asaduzzaman., S. Islam., F. Hossian and R. Alam. 2002. Rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium* through *in vitro* culture. Pakistan Journal of Biological Sciences 5(11): 1170-1172
- Khawar, K. M., I. Parmaksiz, E. O. Sarihan and S. Ozcan. 2005. Mass proliferation of Madonna lily (*Lilium candidum* L) under *in vitro* conditions. Pakistan Journal of Botany 37(2):243-248
- Nhut, D. T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Reports 17:913-916
- Maria, C., D. Stana and I. Pop. 2004. Streptocarpus-Flowering Pot Plant-Propagation and Culture. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, XXXII ISSN 0255-965X
- Reddy, P. S., R. Rodrigues and R. Rajasekharan. 2001. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 66: 183-188
- Rout, G. R., A. Mohapatra and S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances 24: 531-560
- Sharama, N., K. P. S. Chandel and V. K. Srivastava. 1991. In vitro propagation of *Coleus forskohlii* Brig., a threatened medicinal plant. Plant Cell Reports 10: 67-70
- Shimada, Y., G. Mori., M. Oda and G. Ishida. 2007. Effect of BA and Leaf Piece Orientation on Adventitious bud formation in leaf cutting of *Begonia tuberhybrida* Group. Journal of Japan Horticulture 76 (2): 157-162
- Texiera da Silva, J. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology Vol2(12): 683-691
- Zalewska, M., J. Lema-Rumińska and N. Miler. 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. Scientia Horticulturae 113: 70-73
- Biotechnology In Agriculture and Forestry 26 . Medicinal and Aromatic plants VI Edited by Y.P. S. Bajaj Springer 1994
- Trigano N. R and D. J. Gray. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Second Edition. By CRC Press

Opracowanie: Dr Marek Gaj