

Zdolności regeneracyjne liści w kulturach *in vitro* ze szczególnym uwzględnieniem taksonów rodziny *Plantaginaceae*

Emilia ANDRZEJEWSKA-GOLEC, Joanna MAKOWCZYŃSKA

ANDRZEJEWSKA-GOLEC E., MAKOWCZYŃSKA J. 2010. **Regenerative abilities of leaves in *in vitro* cultures with special consideration of *Plantaginaceae* family taxa.** *Wiadomości Botaniczne* 54(1/2): 25–34.

The paper presents the possibility of using isolated leaves for micropropagation of representatives of different plant families. Special attention was paid to species of *Plantaginaceae* family. The regeneration of the genus *Plantago* taxa was described on the basis of reports of different authors (*Plantago lanceolata*, *P. maritima*, *P. ovata*), our previous publications (*P. camtschatica*) and our to date unpublished data (*P. asiatica*).

KEY WORDS: leaf culture, organogenesis *in vitro*, somatic embryogenesis, *Plantago*

Emilia Andrzejewska-Golec, Joanna Makowczyńska, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, e-mail: e.andrzejewska@wp.pl, e-mail: joanna.makowczynska@umed.lodz.pl

WSTĘP

Niektóre rośliny charakteryzują się zdolnością regeneracji z liści *in vivo*, są to m.in. przedstawiciele rodzin: *Gesneriaceae*, *Begoniaceae*, *Crassulaceae*. Hodowcy roślin, także amatorzy, wykorzystują powszechnie to zjawisko do mnożenia begonii, sępolii, streptokarpusów.

Rośliny, które nie mają takich właściwości *in vivo*, można regenerować z liści *in vitro*. Mikrozmnażanie zachodzi wówczas z merystemów przybyszowych w wyniku organogenezy albo embriogenezy bezpośrednio, czy też poprzez organogeny lub embriogeny kalus. Może to mieć duże znaczenie w hodowli (mikropropagacji) roślin ozdobnych, leczniczych i chronionych.

Do regeneracji – jako eksplantatów – używa się całych liści lub ich części. Liście mogą pochodzić z roślin ze stanu naturalnego, hodowanych tradycyjnie, bądź z kultur *in vitro*. Najczęściej stosuje się liście z siewek uzyskanych *in vitro*. Zdolność i intensywność regeneracji jest zależna od bardzo wielu czynników: gatunku i odmiany rośliny, typu pożywki, rodzaju użytych regulatorów wzrostu, ich stężenia i proporcji, od temperatury i światła. Ważny też jest rodzaj eksplantatu: część liścia, jego wiek, pochodzenie. I tak według Saundersa i Doley (1986) młode liście *Beta vulgaris* L. odznaczają się większą zdolnością do pośredniej regeneracji niż w pełni wykształcone liście tej rośliny. Inni autorzy zaobserwowali, że ogonki liściowe buraka wytwarzają najwięcej pędów w miejscu ich

przechodzenia w blaszkę liścia (Detrez et al. 1988). Porównywano zdolności regeneracyjne liścieni i liści siewek *Capsicum annuum* L. Pąki przybyszowe tworzyły się liczniej na eksplantatach liścieniowych. W przypadku liścienia najlepszą pod względem częstotliwości różnicowania pąków przybyszowych okazała się część środkowa, natomiast w przypadku liścia – część dystalna (Gatz, Rogozińska 1994).

MOŻLIWOŚCI REGENERACJI PRZEDSTAWICIELI RÓŻNYCH RODZIN Z EKSPLANTATÓW LIŚCIOWYCH

ORGANOGENEZA BEZPOŚREDNIA

Organogenezę bezpośrednią obserwowano na eksplantatach liściowych w kulturach *in vitro* wielu gatunków roślin, należących do różnych rodzin, m.in.: *Amaryllidaceae* (*Narcissus* sp.), *Asteraceae* (*Anthemis nobilis* L., *Petasites hybridus* (L.) P. Gaertn., Mey. & Scherb., *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.), *Droseraceae* (*Drosera rotundifolia* L.), *Gentianaceae* (*Gentiana triflora* Pall.), *Meliaceae* (*Azadirachta indica* A. Juss cv. Flore Pleno), *Piperaceae* (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.), *Plumbaginaceae* (*Limonium altaica* cv. Emille), *Solanaceae* (*Atropa belladonna* L., *Lycopersicon* sp.) (Zenkter 1971, Ferreira, Handro 1988, Chow et al. 1993, Bobák et al. 1995, Hosokawa et al. 1996, Lech et al. 1996, Wildi et al. 1998, Echeverrigaray et al. 2000, Pereira et al. 2000, Jeong et al. 2001, Salvi et al. 2001). Stwierdzono, że dzikie gatunki pomidora wykazują o wiele wyższe współczynniki namnażania na liściu w porównaniu z odmianami uprawnymi (Lech et al. 1996). Na izolowanych liściach *Nautilocalyx lynchei* Royle (*Gesneriaceae*) obserwowano albo kalogenezę bez morfogenezy lub też kaulogenezę bezpośrednią i ryzogenezę bezpośrednią, zależnie od stężenia auksyny, cytokininy i sacharozy (Tran Thanh Van 1973). Gatunki z klasy jednoliściennych, wytwarzające cebule, są na ogół łatwo rozmnażane *in vitro* poprzez organogenezę bezpośrednią – pędy wytwarzają się tu na eksplantacie, którym jest

fragment liścia w postaci mięsistej łuski cebulowej (lub jej fragmentu), pobranej wraz z piętą (Furmanowa 1992). Chow et al. (1993) stwierdzili, że do mikropropagacji narcyzów z liści konieczna jest obecność nasady liści i można szybko zregenerować narcyzy tylko z samej nasady pojedynczych liści.

ORGANOGENEZA POŚREDNIA

Organogenezę pośrednią w kulturach liści opisano u przedstawicieli takich rodzin jak: *Asteraceae* (*Echinacea purpurea* Moench), *Bignoniaceae* (*Catalpa ovata* G. Don), *Hyacinthaceae* (rodzaje: *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum*, *Scilla*), *Fabaceae* (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh), *Gentianaceae* (*Centaurium erythraea* Rafn), *Hypericaceae* (*Hypericum perforatum* L.), *Lamiaceae* (*Lavandula ×intermedia* Emeric ex Loiseleur, *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill.), *Loranthaceae* (*Dendrophthoe falcata* (L. fil.) Ettings), *Solanaceae* (*Atropa belladonna* L.) (Nag, Johri 1970, Zenkter 1971, Hussey 1975, Dronne et al. 1999, Kintzios et al. 1999b, Lisowska 1999, Pretto, Santarém 2000, Koroch et al. 2002, Balarama Swamy Yadav, Padmaja 2003).

Organogenność kalusa często zależy od rodzaju eksplantatu, z którego wywodzi się kalus. I tak u *Centaurium erythraea* Rafn spośród hypokotyli, liścieni, korzeni i liści najbardziej kaulogennymi okazały się dwa ostatnie (Piątczak, Wysokińska 2003). W przypadku liści, autorki obserwowały zjawisko kalogenezy na ponad 90% eksplantatów. Ponad 70% kalusów tworzyło pędy, a liczba pędów na kalus wynosiła 40 ± 6 .

Zenkter (1971) w kulturach liściowych *Atropa belladonna* L. na pożywce z kinetyną (KIN) i kwasem indolilo-3-octowym (IAA) obserwował kaulogenezę bezpośrednią w przypadku całych liści, natomiast na fragmentach liści w tych samych warunkach kultury tworzył się kaulogenny kalus. Gdy pożywkę pozbawiono kinetyny, następowała jedynie ryzogeneza, a gdy pożywka nie zawierała ani KIN, ani IAA, w ogóle nie obserwowano morfogenezy.

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA BEZPOŚREDNIA

Występowanie w liściowych kulturach *in vitro* zjawiska somatycznej embriogenezy bezpośredniej opisano u rodzin: *Convolvulaceae* (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), *Euphorbiaceae* (*Manihot esculenta* Crantz), *Hippocastanaceae* (*Aesculus hippocastanum* L.), *Piperaceae* (*Piper colubrinum* Link), *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum* L.) (Profumo et al. 1986, Stamp, Henshaw 1987, Stolarz et al. 1991, Zheng et al. 1996, Yusuf et al. 2001, Ma, Xu 2002).

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA POŚREDNIA

Somatyczną embriogenezę pośrednią opisano u rodzin: *Actinidiaceae* (*Actinidia chinensis* Planch.), *Apiaceae* (*Eryngium foetidum* L.), *Convolvulaceae* (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), *Buxaceae* (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider), *Fabaceae* (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.), *Fagaceae* (*Quercus robur* L.), *Gentianaceae* (*Gentiana kurroo* Royle), *Hippocastanaceae* (*Aesculus hippocastanum* L.), *Lamiaceae* (*Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill.), *Mimosaceae* (*Acacia sinuata* (Lour.) Merr.), *Rosaceae* (*Rosa hybrida* L.), *Theaceae* (*Camelia sinensis* (L.) O. Kunze) (Dameri et al. 1986, Ahmed et al. 1996, Kato 1996, Ludvová, Ostroľucká 1998, Cuenca et al. 1999, Ignacimuthu et al. 1999, Kintzios et al. 1999a, b, Hamama et al. 2001, Vengadesan et al. 2002, Fiuk et al. 2003, Gersberg et al. 2004).

W kulturach liściowych, podobnie jak w wielu innych typach kultur *in vitro*, kierunek różnicowania się komórek eksplantatu zależy od zastosowanych hormonów i ich stężeń. Na przykład Stipp et al. (2001) obserwowali na liścieniach i blaszkach liściowych *Cucumis melo* L. var. *inodorus*, zależnie od dodanych regulatorów wzrostu, albo organogenezę, albo embriogenezę. W kulturach liściowych *Gentiana kurroo* Royle, zależnie od zastosowanych hormonów i ich stężeń, tworzył się kalus, zarodki somatyczne lub korzenie. Zarodki pojawiały się najczęściej w towarzystwie korzeni i kalusa lub powstawały bezpośrednio z komórek skórki i miększu palisadowego (Fiuk et al.

2003). Niekiedy obserwowano na eksplantatach liściowych oba zjawiska obok siebie: organogenezę i somatyczną embriogenezę. I tak Ludvová i Ostroľucká (1998) opisały współistnienie pośredniej organogenezy i pośredniej embriogenezy w określonych warunkach kultury liściowej *Actinidia chinensis* Planch. Na izolowanych liściach *Echeveria elegans* Bgr. (*Crassulaceae*) obserwowano kalogenezę, kaulogenezę, ryzogenezę oraz somatyczną embriogenezę (Raju, Mann 1970). Stwierdzono, że w młodszych liściach somatyczna embriogeneza zachodzi łatwiej (Kato 1996).

Droga różnicowania w kulturach *in vitro*, również w kulturach liściowych, jest także zależna od odmiany rośliny. Doley i Saunders (1989) zaobserwowali to w przypadku kultur liściowych odmian buraka *Beta vulgaris* L., Kato (1996) w przypadku takich kultur odmian *Camelia sinensis* (L.) O. Kunze, a Kintzios et al. (1999a) – odmian róż.

Rośliny uzyskane na drodze organogenezy, czy embriogenezy, szczególnie pośrednio poprzez kalus, mogą różnić się fenotypowo i genotypowo od rośliny macierzystej, co spowodowane jest zmiennością somaklonalną, powstającą w kulturach spontanicznie, kontrolowaną tylko w ograniczony sposób (Evans et al. 1984, Przybecki 1994, Skucińska 2001).

GATUNKI RODZINY *PLANTAGINACEAE*
W KULTURACH *IN VITRO*

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej od wielu lat interesuje się roślinami leczniczymi z rodziny *Plantaginaceae*. W ramach tych zainteresowań autorki zajęły się kulturami *in vitro* dalekowschodnich gatunków leczniczych: *Plantago asiatica* L. i *P. camtschatica* Link. (Makowczyńska, Andrzejewska-Golec 2000, 2003, 2006, Andrzejewska-Golec, Makowczyńska 2008). Poza tym autorki prowadzą kultury taksonów rzadkich, prawnie chronionych w Polsce: *P. maritima* L. (Makowczyńska, Andrzejewska-Golec 2009) i *P. coronopus* L. (Makowczyńska, Andrzejewska-Golec – dane niepublikowane). Natomiast kultury *in vitro* takich ważnych

leczniczych przedstawicieli rodzaju *Plantago* jak: *P. major* L., *P. lanceolata* L. i *P. ovata* Forsk są w kręgu zainteresowań innych autorów (Barna, Wakhlu 1988, Brimer 1988, Mederos-Molina, Méndez 1991, Barot et al. 1994, Pramanik et al. 1995, Chang, Locy 1996, Tu 1996, Budzianowska, Skrzypczak 1998, Budzianowska et al. 2004, Khawar et al. 2005).

REGENERACJA TAKSONÓW PLANTAGINACEAE IN VITRO Z LIŚCI

Przedstawiciele rodzaju *Plantago* nie mają zdolności regeneracji z liści *in vivo*.

Plantago asiatica L.

– babka azjatycka

Plantago asiatica L. (syn. *P. major* L. var. *asiatica* Decne) występuje pospolicie w krajach Dalekiego Wschodu, gdzie jest cenioną rośliną leczniczą, stosowaną w leczeniu od niepamiętnych czasów. Figuruje w farmakopei japońskiej i chińskiej. Natomiast w Europie jest gatunkiem prawie nieznanym, hodowanym tylko w niektórych ogrodach botanicznych. Pierwsze doniesienie o kulturach *in vitro* *P. asiatica* ukazało się w czasopiśmie chińskim (w języku chińskim) w roku 1996 (Tu 1996). Zregenerowano wówczas ten takson na drodze pośredniej

Tabela 1. Kultury *in vitro* blaszek i ogonków liściowych *P. asiatica* L., eksplantaty z 6-tygodniowych pędów wyhodowanych *in vitro*, pożywka MS z dodatkiem 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg/dm³ BA (w każdym eksperymencie użyto 20 eksplantatów).

Table 1. Blade and petiole cultures of *Plantago asiatica* L., explants from 6-week shoots obtained *in vitro*, MS basal medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA (for each treatment 20 explants were used).

Tydzień hodowli Week of culture	Blaszka liściowa Leaf blade									
	Kalogeneza Callogenesis	Kaulogeneza Caulogenesis						Ryzogeneza Rhizogenesis		
		PC		PN		PZ				
		%	L±SE	%	L±SE	%	L±SE			%
4	85	25	0,7±0,4	5	0,2±0,2	5	0,1±0,1	30	1,7±0,7	
6	85	55	2,3±0,6	35	0,6±0,2	25	0,7±0,3	40	2,8±0,9	
8	85	70	7,1±2,1	50	3,0±0,8	50	2,7±0,8	55	3,4±1,1	

Tydzień hodowli Week of culture	Ogonek liściowy Leaf petiole									
	Kalogeneza Callogenesis	Kaulogeneza Caulogenesis						Ryzogeneza Rhizogenesis		
		PC		PN		PZ				
		%	L±SE	%	L±SE	%	L±SE			%
4	95	50	1,3±0,4	0	–	10	0,1±0,1	85	4,9±0,9	
6	100	70	3,5±0,6	20	0,7±0,4	20	0,6±0,3	90	9,2±0,3	
8	100	95	8,0±1,1	45	1,7±0,6	75	2,7±0,7	95	12,0±1,9	

PC – pąki (buds)

PN – pędy niezmienione (normal shoots)

PZ – pędy zmienione (abnormal shoots)

L±SE – średnia liczba pąków, pędów lub korzeni przypadająca na jeden eksplantat ± błąd standardowy

L±SE – mean number of buds and shoots or roots obtained per one explant ± standard error

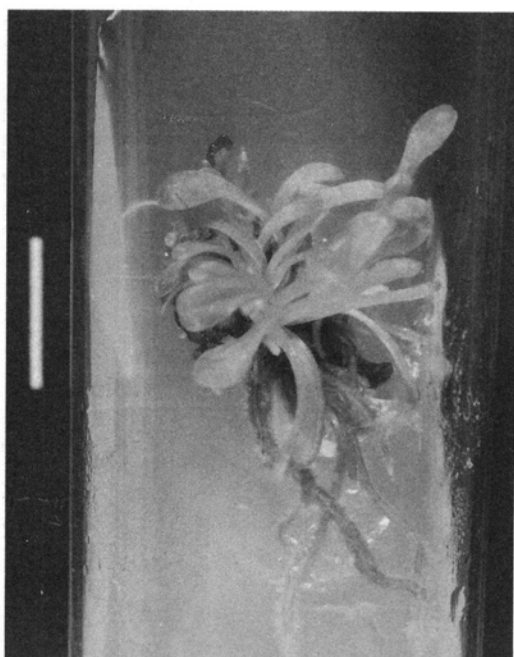


Ryc. 1. Kultura liści *Plantago asiatica* L. Pośrednia kaulogeneza na ogonku liściowym pochodzącym z 8-tygodniowego pędu; 5-tygodniowa kultura. Podłoże MS uzupełnione 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg /dm³ BA. Skala = 1 cm.

Fig. 1. Leaf culture of *Plantago asiatica* L. Indirect caulogenesis on the leaf petiole from an 8-week-old shoot; 5-week culture. MS medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA. Scale bar = 1 cm.

organogenezy. W Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi badania nad kulturami *Plantago asiatica* prowadziliśmy w latach 1998–2008 (Andrzejewska-Golec 1998, Makowczyńska, Andrzejewska-Golec 2000, 2003, 2006, Andrzejewska-Golec, Makowczyńska 2001, Makowczyńska 2006, Makowczyńska et al. 2008).

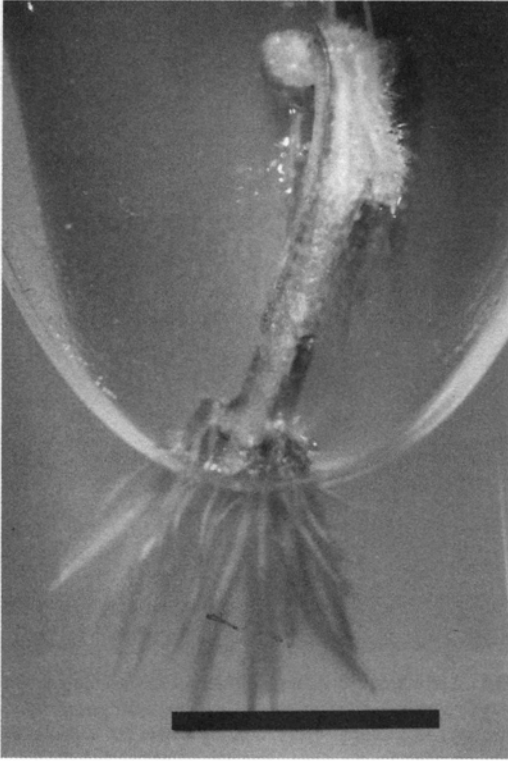
Wyniki badań nad regeneracją tej rośliny z liści przedstawiliśmy jedynie częściowo na krajowych kongresach: botanicznym i farmaceutycznym (Andrzejewska-Golec 1998, Andrzejewska-Golec, Makowczyńska 2001). Jako eksplantaty stosowano blaszki i ogonki liści, a także części blaszek i ogonków pochodzące z 6- lub 8-tygodniowych pędów wyhodowanych *in vitro*. Najlepszym podłożem dla tych kultur okazało się podłoże Murashige'a i Skooga (MS),



Ryc. 2. Kultura liści *Plantago asiatica* L. Pośrednia kaulo- i ryzogeneza na blaszce liściowej pochodzącej z 6-tygodniowego pędu; kultura 7-tygodniowa. Podłoże MS uzupełnione 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg /dm³ BA. Skala = 1 cm.

Fig. 2. Leaf culture of *Plantago asiatica* L. Indirect caulogenesis and rhizogenesis on the leaf blade from a 6-week-old shoot; 7-week culture. MS medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA. Scale bar = 1 cm.

wzbogacone auksyną (IAA) (0,1 mg/dm³) i cytokininą 6-benzyloadeniną (BA) (2 mg/dm³). Wybrane wyniki przedstawiono w Tab. 1 i na Ryc. 1–6. Kalogeneza rozpoczynała się w 2 lub 3 tygodniu kultury. Podczas 8 tygodni wytworzył się jasnozielonokremowy morfogeny kalus o średnicy ok. 0,5–2,0 cm, w 100% na ogonkach liściowych i w ok. 90% na blaszkach liściowych. Pędy powstawały wyłącznie na drodze organogenezy pośredniej (Ryc. 1, 2). Część spośród nich uległa somaklonalnej zmienności (Ryc. 5). Do dalszych etapów mikropropagacji używano tylko pędów niezmiennych. W 8-tygodniowej kulturze blaszek liściowych, pochodzących z 6-tygodniowych pędów, obserwowano 7,1±2,1 pąków i 3,0±0,8 pędów, a w takiej samej kulturze ogonków liściowych – 8,0±1,1 pąków i 1,7±0,6 pędów na



Ryc. 3. Kultura liści *Plantago asiatica* L. Kalo- i ryzogeneza na ogonku liściowym pochodzącym z 8-tygodniowego pędu; 3-tygodniowa kultura. Podłoże MS uzupełnione 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg/dm³ BA. Skala = 1 cm.

Fig. 3. Leaf culture of *Plantago asiatica* L. Callo- and rhizogenesis on the leaf petiole from an 8-week-old shoot; 3-week culture. MS medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA. Scale bar = 1 cm.

eksplantat (Tab. 1). W przypadku eksplantatów pobranych z 8-tygodniowych pędów uzyskano gorsze wyniki.

Korzenie na eksplantatach tworzyły się na drodze bezpośredniej lub pośredniej (Ryc. 3, 4).

Zregenerowane rośliny dobrze aklimatyzowały się w doniczkach w warunkach pokojowych i w 5 tygodniu hodowli 30% z nich wytworzyło normalnie wykształcone kwiatostany z niezmięzionymi kwiatami (Ryc. 6). Rośliny przeniesione do warunków polowych obficie kwitły, wytworzyły owoce z płodnymi nasionami.



Ryc. 4. Kultura liści *Plantago asiatica* L. Bezpośrednia ryzogeneza na blaszce liściowej pochodzącej z 8-tygodniowego pędu; 3-tygodniowa kultura. Podłoże MS uzupełnione 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg/dm³ BA. Skala = 1 cm.

Fig. 4. Leaf culture of *Plantago asiatica* L. Direct rhizogenesis on the leaf blade from an 8-week-old shoot; 3-week culture. MS medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA. Scale bar = 1 cm.

Plantago camtschatica Link – babka kamczacka

Plantago camtschatica Link (syn. *P. depressa* Wild. subsp. *camtschatica* (Cham. ex Link) Pilg.) jest taksonem dalekowschodnim, stosowanym w lecznictwie tamtego obszaru.

W Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej gatunek ten został zregenerowany z różnych eksplantatów, m.in. z pierwszych liści pochodzących z siewek (Andrzejewska-Golec, Makowczyńska 2008). Stosowano 0,1 mg/dm³

IAA i 3 różne cytokiny: BA, KIN, zeatynę (ZEA) w stężeniu 2 mg/dm³. W przypadku BA 82% eksplantatów wytwarzało w ciągu 6-tygodniowej kultury pąki i pędy, a liczba pąków i pędów na eksplantat wyniosła 5,2±1,3, w przypadku ZEA uzyskano podobne wyniki: 80%



Ryc. 5. Zmieniony mikropęd z eksplantatu liściowego *P. asiatica*. Podłoże Schenka i Hildebrandta (SH) uzupełnione 0,1 mg/dm³ NAA i 2 mg/dm³ BA, × 16.

Fig. 5. Abnormal microshoot from the leaf explant of *P. asiatica*. SH medium supplemented with 0.1 mg/dm³ NAA and 2 mg/dm³ BA, × 16.

i 6,5±1,4. Jednak zastosowanie BA pozwoliło otrzymać ponad 40% pędów ukorzenionych, użycie ZEA – tylko ok. 17%. Cytokina KIN okazała się nieodpowiednia ze względu na znaczny procent (ponad 40%) pąków i pędów zniekształconych (Andrzejewska-Golec, Makowczyńska 2008).

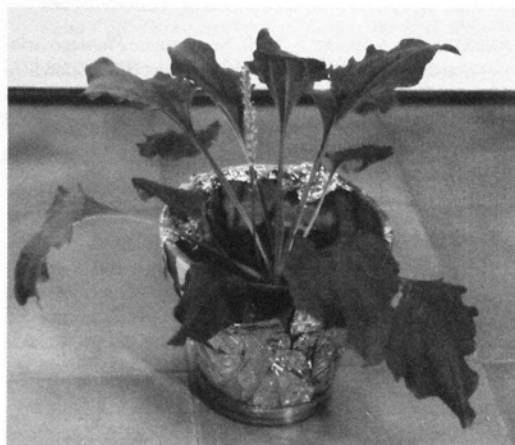
Plantago lanceolata L.
– babka lancetowata

Jest to gatunek prawie kosmopolityczny. Liście są cenionym surowcem farmaceutycznym – pod nazwą *Plantaginis lanceolatae folium* figurują w *Farmakopei Polskiej VIII*. Można je pozyskiwać i ze stanowisk naturalnych, które zanikają ze względu na powszechne stosowanie herbicydów, i z upraw. Budzianowska et al.

(1998, 2004) opracowała mikrorozmnazanie tej rośliny. Z badań tych autorów wynika, że mikropropagacja *P. lanceolata* jest najbardziej efektywna (wydajność: 4 pędy na eksplantat) poprzez bezpośrednią organogenezę na liściowych bądź korzeniowych eksplantatach pochodzących z siewek, na podłożu MS wzbogaconym IAA (2 mg/dm³) i KIN (2 mg/dm³).

Plantago maritima L.
– babka nadmorska

Ta europejska bylina swoim zasięgiem obejmuje głównie morskie wybrzeża. W Polsce podlega prawnej ochronie. Figuruje w Polskiej Czerwonej Księdze jako gatunek rzadki, ginący (Piotrowska 2001). Kultury *in vitro* tego taksonu zapoczątkowali Chang i Locy (1996). Zregenerowali oni *P. maritima* jedynie z liściowych eksplantatów, zarówno na drodze bezpośredniej (podłoże MS i Gamborga (G5), wzbogacone 2% sorbitolem oraz 0,1 mg/dm³ kwasem naftylo-1-octowym (NAA) i 2 mg/dm³ BA), jak i pośredniej (MS, G5, wzbogacone 2% sacharozą, 1 mg/dm³ 2,4-D, 0,5 mg/dm³ KIN i 1g/l aktywowanego węgla). Uzyskali na tej drodze niezmienione fenotypowo rośliny, kwitnące i wytwarzające płodne nasiona.



Ryc. 6. Kwitnąca roślina *P. asiatica* pochodząca z ogonka liściowego; 5-tygodniowa kultura doniczkowa, × 0,25.

Fig. 6. Flowering plant of *P. asiatica* derived from leaf petiole; 5-week pot culture, 0,25.

Plantago ovata Forsk.

– babka jajowata

Jest to jednoroczny gatunek rosnący dziko w południowej Hiszpanii, północnej Afryce oraz południowo-wschodniej Azji. Jest także uprawiany na szeroką skalę w wielu krajach. Figuruje w licznych farmakopeach, również w *Farmakopei Polskiej VIII (Plantaginis ovatae semen, Plantaginis ovatae seminis tegumentum)*. Badacze hinduscy (Barot et al. 1994) opracowali mikrorozmnażanie tej rośliny z liściowych eksplantatów pochodzących z uzyskanych *in vitro* 15-dniowych siewek. Według tych autorów najodpowiedniejszą do regeneracji na drodze organogenezy bezpośredniej częścią liścia jest część proksymalna; na eksplantacie wytwarza się wówczas 3–10 pędów. Autorzy stosowali auksynę NAA i cytokininy BAP lub KIN. Pierwsza cytokinina okazała się lepsza (90% eksplantatów regenerowało pędy) i właściwsze okazały się wyższe stężenia tej cytokininy. W niższych następowała jedynie kalogeneza.

LITERATURA

- AHMED R., GUPTA S. D., DEEPESH N. D. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf derived callus of winged bean [*Psopocarpus tetragonolobus* (L.) DC.]. *Plant Cell Rep.* **15**: 531–535.
- ANDRZEJEWSKA-GOLEC E. 1998. Namnażanie *Plantago asiatica* L. z blaszek i ogonków liściowych w hodowli *in vitro*. W: B. FILIPEK, T. LIBROWSKI, M. SCHLEGEL-ZAWADZKA (red.), *Farmacja w perspektywie XXI w. XVII Naukowy Zjazd PTF*. Kraków, 10–13 września, 1998. Streszczenia. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Kraków–Warszawa 1998, s. 279.
- ANDRZEJEWSKA-GOLEC E., MAKOWCZYŃSKA J. 2001. Różnicowanie pędów z tkanki kalusowej *Plantago asiatica* L. W: E. ZENKTELER (red.), *Botanika w dobie biologii molekularnej. Materiały sesji i sympozjów 52. Zjazdu PTB*. Poznań, 24–28 września 2001. Polskie Towarzystwo Botaniczne, Poznań, s. 159.
- ANDRZEJEWSKA-GOLEC E., MAKOWCZYŃSKA J. 2008. Micropropagation of *Plantago camtschatica* Link. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **77**(4): 269–273.
- BALARAMA SWAMY YADAV P., PADMAJA V. 2003. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**: 197–200.
- BARNA K. S., WAKHLU A. K. 1988. Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovata* Forssk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **15**: 169–173.
- BAROT S. M., JASRAI Y. T., MEHTA A. R. 1994. *In vitro* organogenesis from leaf explants in *Plantago ovata*. W: PRAMOD TANDON (red.), *Advances in plant tissue culture in India*. Pragati Prakashan, Meerut (India), s. 82–85.
- BOBÁK M., BLEHOVÁ A., KRIŠTIN J., OVEČKA M., ŠAMAJ J. 1995. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **43**: 43–49.
- BRIMER L. 1988. Production of plantamajoside and verbas-coside in suspension cell cultures of *Plantago major* ssp. *major*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **24**: 36A.
- BUDZIANOWSKA A., SKRZYPCZAK L. 1998. Wstępna analiza związków fenolowych *Plantago lanceolata* L. ze stanowiąc naturalnych i kultur *in vitro*. W: J. MIĄDLIKOWSKA (red.), *Botanika polska u progu XXI wieku. Materiały sympozjum i obrad sekcji 51. Zjazdu PTB*. Gdańsk, 15–19 września, 1998. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań, s. 65.
- BUDZIANOWSKA A., SKRZYPCZAK L., BUDZIANOWSKI J. 2004. Phenylethanoid glucosides from *in vitro* propagated plants and callus cultures of *Plantago lanceolata*. *Planta Med.* **70**: 834–840.
- CHANG I. D., LOCY R. D. 1996. *In vitro* regeneration of plants of the halophyte *Plantago maritima* L. from primary explants and callus cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **32**: 91A.
- CHOW Y. N., SELBY C., FRASER T. W., HARVEY B. M. R. 1993. Basal plate tissue in *Narcissus* bulbs and shoot clump cultures: its structure and role in organogenic potential of single leaf cultures. *Ann. Bot.* **71**: 437–443.
- CUENCA B., SAN-JOSÉ M. C., MARTÍNEZ M. T., BALLESTER A., VIEITEZ A. M. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant Cell Rep.* **18**: 538–543.
- DAMERI R. M., CAFFARO L., GASTALDO P., PROFUMO P. 1986. Callus formation and embryogenesis with leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Journal of Plant Physiology* **126**: 93–96.
- DETREZ C., TETU T., SANGWAN R. S., SANGWAN-NORREEL B. S. 1988. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **39**(7): 917–926.
- DOLEY W. P., SAUNDERS J. W. 1989. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole plant leaf explants in some sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) populations. *Plant Cell Rep.* **8**: 222–225.
- DRONNE S., JULLIEN F., CAISSARD J.-C., FAURE O. 1999.

- A simple and efficient method for in vitro shoot regeneration from leaves of lavender (*Lavandula ×intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Plant Cell Rep.* **18**: 429–433.
- ECHVERRIGARAY S., FRACARO F., ANDRADE L. B., BISASIO S., ATTI-SERAFINI L. 2000. In vitro shoot regeneration from leaf explants of roman chamomile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 1–4.
- EVANS D. A., SHARP W. R., MEDINA-FILHO H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Amer. J. Bot.* **71**(6): 759–774.
- FARMAKOPEA POLSKA 2008. Praca zbiorowa. Wyd. 8. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. Warszawa.
- FERREIRA C. M., HANDRO W. 1988. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. *Planta Med.* **54**: 157–160.
- FIUK A., RAJKIEWICZ M., RYBCZYŃSKI J. J. 2003. *Gentiana kurroo* (Royle) w kulturach in vitro. *Biotechnologia* **62**(3): 267–274.
- FURMANOWA M. 1992. Mikrorozmnażanie roślin leczniczych. *Biotechnologia* **19**(4): 17–20.
- GATZ A., ROGOZIŃSKA J. 1994. In vitro organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annum* L., cv. Bryza. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **63**(3–4): 255–258.
- GERSZBERG A., MACIOSZEK V. K., ŁUCHNIAK P., KONONOWICZ A. K. 2004. Evaluation of competent embryo production and conversion potential in callus cultures initiated in vitro from leaf explants of six sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] genotypes. *Biotechnologia* **64**(1): 156–168.
- HAMAMA L., BAAZIZ M., LETOUZÉ R. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 109–113.
- HOSOKAWA K., NAKANO M., OIKAWA Y., YAMAMURA S. 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem, and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. *Plant Cell Rep.* **15**: 578–581.
- HUSSEY G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. *Journal of Experimental Botany* **26**(2): 253–262.
- IGNACIMUTHU S., AROCKIASAMY S., ANTONYSAMY M., RAVICHANDRAN P. 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 131–137.
- JEONG J. H., MURTHY H. N., PAK K. Y. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 123–128.
- KATO M. 1996. Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots. *Plant Cell Rep.* **15**: 920–923.
- KHAWAR K. M., SARIHAN E. O., SEVIMAY C. S., COCU S., PARMAKSIZ I., URANBEY S., IPEK A., KAYA M. D., SANCAK C., OZCAN S. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. *Periodicum Biologorum* **107**: 113–116.
- KINTZIOS S., MANOS C., MAKRI O. 1999a. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep.* **18**: 467–472.
- KINTZIOS S., NIKOLAOU A., SKOULA M. 1999b. Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Rep.* **18**: 462–466.
- KOROCH A., JULIANI H. R., KAPTEYEN J., SIMON J. E. 2002. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 79–83.
- LECH M., MICZYŃSKI K., PINDEL A. 1996. Comparison of regeneration potentials in tissue cultures of primitive and cultivated tomato species (*Lycopersicon* sp.). *Acta Soc. Bot. Poloniae* **65**(1–2): 53–56.
- LISOWSKA K. 1999. Związki biologicznie czynne w transformowanych i nietransformowanych tkankach i organach *Catalpa ovata* G. Don w hodowli in vitro. Praca doktorska wykonana w Akademii Medycznej, Łódź.
- LUDVOVÁ A., OSTROLUCKÁ M. G. 1998. Morphogenic processes in callus tissue cultures and de novo regeneration of plants in *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **67**(3–4): 217–222.
- MA G., XU Q. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoot from immature leaves of cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**: 281–288.
- MAKOWCZYŃSKA J. 2006. Mikrorozmnażanie *Plantago asiatica* L. Badania histologiczne i cytologiczne. Praca doktorska wykonana w Uniwersytecie Medycznym, Łódź.
- MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E. 2000. Somatic embryogenesis in in vitro culture of *Plantago asiatica* L. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **69**(4): 245–250.
- MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E. 2003. Micropropagation of *Plantago asiatica* L. through culture of shoot-tips. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **72**(3): 191–194.
- MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E. 2006. Somatic seeds of *Plantago asiatica* L. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **75**(1): 17–21.
- MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E. 2009. Micropropagation of *Plantago maritima* L. – a vanishing species in Poland. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **78**(1): 13–18.
- MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E., SŁIWINSKA E. 2008. Nuclear DNA content in different plant

- materials of *Plantago asiatica* L. cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94**: 65–71.
- MEDEROS-MOLINA S., MÉNDEZ M. 1991. Tissue cultures studies on *Plantago major* L.: I. Use of shoot tip explants. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **27**: 386.
- NAG K. K., JOHRI B. M. 1970. Effects of cytokinins and injury on the formation of shoot buds by leaves of *Dendrophthoe falcata*. *Planta (Berl.)* **90**: 360–364.
- PEREIRA A. M. S., BERTONI B. W., APPEZZATO-DA-GLORIA B., ARAUJO A. R. B., JANUARIO A. H., LOURENCO M. V., FRANCA S. C. 2000. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 47–53.
- PIĄTCZAK E., WYSOKIŃSKA H. 2003. In vitro regeneration of *Centaureum erythraea* Rafn from shoot tips and other seedlings explants. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **72**: 283–288.
- PIOTROWSKA H. 2001. *Plantago maritima* L. Babka nadmorska. W: R. KAŻMIERCZAKOWA, K. ZARZYCKI (red.), Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Instytut Ochrony Przyrody, PAN, Kraków, s. 347–348.
- PRAMANIK S., CHAKRABORTY S., RAYCHAUDHURI S. S. 1995. In vitro clonal propagation and characterization of clonal regenerants of *Plantago ovata* Forssk. by isozyme analysis. *Cytobios* **82**: 123–130.
- PRETTO F. R., SANTARÉM E. R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**: 107–113.
- PROFUMO P., CASTALDO P., DAMERI R. M., CAFFARO L. 1986. Histological study of calli and embryos from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Journal of Plant Physiology* **126**: 97–103.
- PRZYBECKI Z. 1994. Rośliny powstałe drogą somatycznej embriogenezy. *Postępy Biologii Komórki* **21**(supl. 4): 49–55.
- RAJU M. V., MANN H. E. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Canad. J. Bot.* **48**: 1887–1891.
- SALVI N. D., SINGH H., TIVAREKAR S., EAPEN S. 2001. Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 159–162.
- SAUNDERS J. W., DOLEY W. P. 1986. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and somaclonal variant for in vitro behavior. *Journal of Plant Physiology* **124**: 473–479.
- SKUCIŃSKA B. 2001. Indukcja zmienności genetycznej in vitro. *Biotechnologia* **54**(3): 145–151.
- STAMP J. A., HENSHAW G. G. 1987. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. *Ann. Bot.* **59**: 445–450.
- STIPP L. C. L., MENDES B. M. J., PIEDADE S. M. D. S., RODRIGUEZ A. P. M. 2001. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* L. var. *inodorus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 81–89.
- STOLARZ A., MACEWICZ J., LÖRZ H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology* **137**: 347–357.
- TRAN THANH VAN M. 1973. In vitro control of de novo flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* **246**(2): 44–45.
- TU Y. 1996. Tissue culture of Asiatic plantain (*Plantago asiatica*). *Zhongcaoyao* **27**: 296–298.
- VENGADESAN G., GANAPATHI A., AMUTHA S., SELVARAJ N. 2002. In vitro propagation of *Acacia* species – review. *Plant Sci.* **163**: 663–671.
- WILDI E., SCHAFFNER K., BERGER BÜTER K. 1998. In vitro propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. *Plant Cell Rep.* **18**: 336–340.
- YUSUF A., TYAGI R. K., MALIK S. K. 2001. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 255–258.
- ZENKTELER M. A. 1971. Development of new plants from leaves and roots of *Atropa belladonna* L. in the in vitro culture. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **40**(2): 305–313.
- ZHENG Q., DESSAI A. P., PRAKASH C. S. 1996. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* **15**: 381–385.