

1. Wstęp

Biotechnologia roślinna poza dużymi wartościami poznawczymi ma już wyraźne znaczenie praktyczne. Przejawiło się ono głównie w masowym rozmnażaniu *in vitro* wielu gatunków użytkowanych w różny sposób przez człowieka. Dzięki współdziałaniu nauk biologicznych, chemicznych i technologicznych przekonano się, jak można użytkować informację genetyczną zawartą w komórkach somatycznych, jak ingerować w fenotyp i genotyp roślinny, zmieniać jego procesy fizjologiczne i szlaki metaboliczne. Wynikiem tych badań jest doprowadzenie do szybkiego namnażania oraz otrzymywania coraz większej liczby roślin o nowych cechach różnej natury, które są wynikiem zmian genetycznych jak i czynników epigenetycznych.

Mikrorozmnażanie (mikropropagacja) polega na rozwoju w hodowli *in vitro*, z istniejących lub przybyszowych merystemów, organów i małych roślinek (*plantlets*) nadających się do dalszego wzrostu w gruncie. Ta droga rozmnażania ma wiele zalet, pozwala bowiem na:

- zwiększenie wskaźnika namnażania,
- skrócenie okresu wegetacji,
- otrzymywanie zregenerowanych roślin o dowolnej porze roku,
- reprodukcję roślin, które w pewnych warunkach nie wydają nasion lub mają one małą siłę kiełkowania,
- otrzymywanie roślin wolnych od wirusów,
- przechowywanie zregenerowanych organów i roślinek w niskich temperaturach dodatnich,
- otrzymywanie roślin o zmienionej liczbie chromosomów,
- wyselekcjonowanie linii roślin o odpowiednim fenotypie.

Do zapoczątkowania hodowli służą tkanki i fragmenty organów roślinnych (eksplantaty), które przeniesione na sterylną pożywkę mogą w warunkach *in vitro* rozrastać się i różnicować. W skład pożywek wchodzi zwykle sole nieorganiczne, cukier, witaminy, cytokininy, auksyny i inne regulatory wzrostu. Wszystkie czynności związane z przenoszeniem tkanek na świeżą pożywkę prowadzone są w warunkach sterylnych.

2. Metody mikrorozmnażania roślin

Regeneracja roślin w kulturze *in vitro* następuje bądź z istniejących merystemów roślinnych (zarodek, pączki szczytowe i boczne), bądź z merystemów przybyszowych, które wytwarzają się bezpośrednio na eksplantacie lub pośrednio przy udziale kalusa, tj. nieodróżnicowanej masy jednorodnych, parenchymatycznych komórek obrastających eksplantat. Z merystemów przybyszowych na odpowiedniej pożywce rozwijać się mogą pędy; najczęściej wymagają one właściwych regulatorów wzrostu do ukorzenienia; mogą też powstawać somatyczne zarodki, które rozwijają się w roślinki.

Zasady wegetatywnego rozmnażania roślin metodami hodowli tkanek *in vitro* przedstawiła Zenkeler (1). W ten sposób otrzymywanych jest wiele sadzonek roślin ozdobnych, warzywnych, przyprawowych, użytkowych, a także drzew i krzewów. Mikrorozmnażanie roślin leczniczych

opisali Bajaj i. in. (2). Przytoczyli oni liczbę 137 gatunków mnożonych *in vitro*. Obecnie jednak można przyjąć, że lista ta znacznie się powiększyła. Monografie dotyczące mikropropagacji i chemizmu roślin leczniczych i aromatycznych przedstawiane są w *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (ed. Y.P.S. Bajaj), tj. w kolejnych tomach ciągłego wydawnictwa Springer-Verlag (2). Prace dotyczące mikrorozmnażania roślin leczniczych w Polsce prowadzone są głównie w środowiskach farmaceutycznych (w Krakowie, Łodzi, Poznaniu i Warszawie). Z gatunków, które figurują w *Farmakopei polskiej*, wyd. V, proces mikrorozmnażania opracowany jest dla około 40 roślin leczniczych, tj. połowy wymienionych w tym dziele. Przeglądu badań dokonały Furmanowa i Olszowska (3). Dobrego opanowania różnych technik mikropropagacji wymagają szczególnie rośliny, które w Polsce w stanie naturalnym nie rosną, mogą być jedynie aklimatyzowane lub takie, które nie zawsze zawiązują nasiona. Dobór metody uzależniony jest zwykle od kilku czynników: cech morfologicznych i fizjologicznych roślin, rodzaju eksplantatu pobieranego do badań i ostatecznego celu jaki ma być uzyskany. Przy wyborze metody pamiętać należy również o obserwowanej często zmienności organizmów w hodowli *in vitro*. Zmiana genotypu powstać może przy mnożeniu roślin za pośrednictwem kalusa, zwłaszcza przy organogenezie, gdy z ośrodków merystematycznej aktywności wyrasta pęd wymagający do ukorzenia przeniesienia na inną pożywkę z odpowiednimi regulatorami wzrostu. Stałość genotypu zapewnia regeneracja pędów z istniejących już merystemów. Ta metoda jest szczególnie przydatna do mikrorozmnażania przedstawicieli rodziny wargowych – Labiatae (4).

Przykładem mikrorozmnażania roślin z istniejących merystemów jest ceniona w lecznictwie roślina nie występująca we florze polskiej – *Catharanthus roseus*. Gatunek ten badany był w Polsce przez kilka zespołów z różnych ośrodków naukowych. Prace te dostarczyły informacji o tworzeniu się alkaloidów w całym okresie rozwojowym rośliny. Wstępne badania fitochemiczne roślinek wyrosłych *in vitro* i rozwiniętych z nich (w namiotach foliowych) dojrzałych okazów, wykazały inny skład jakościowy alkaloidów monomerycznych – katarantyny i windoliny składających się na jedną cząsteczkę dimerycznego alkaloidu winblastyny, działającego przeciwnowotworowo (5). Przez pączki boczne rozmnażana jest również *Coluria geoides* – koluria kuklikowa, roślina syberyjska (6). Bardzo cennym surowcem leczniczym są jej korzenie, zawierające olejek, którego głównym składnikiem jest eugenol o działaniu bakteriobójczym. Związek ten nie występuje w większych ilościach w roślinach flory polskiej. Ze względu na potrzebę uzyskania dużej masy surowca opracowywana jest metoda hodowli *in vitro*, w pożywce płynnej, samych korzeni. Dalším etapem będzie otrzymanie transgenicznych korzeni transformowanych (*hairy roots*).

Przykładem regeneracji roślin następującej z merystemów przybyszowych, tworzących się w kalusie, jest *Bergenia crassifolia*, gatunek syberyjski zawierający arbutynę o działaniu antyseptycznym (7). Ta sama metoda jest też stosowana do rozmnażania cięplolubnej rośliny *Dioscorea deltoidea*, która w naszym klimacie nie rośnie (8). Wiele gatunków z tego rodzaju zawiera diosgeninę – sapogenię steroidową, wykorzystywaną do produkcji kortykosteroidów i hormonów płciowych. Leki steroidowe otrzymywane z diosgeniny są wymieniane wśród 10 najczęściej przepisywanych preparatów w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. Pędy *Dioscorea deltoidea* dobrze rozwijają się z kalusa, a korzenie, zależnie od użytych regulatorów wzrostu różnią się morfologicznie i anatomicznie. Doskonale metody hodowli otrzymano 1,34% diosgeniny w pędach zregenerowanych *in vitro*. Zawartość ta odpowiada ilości związku w roślinach pochodzących z gruntu.

Poza wymienionymi gatunkami obcego pochodzenia zachodzi często potrzeba rozmnażania *in vitro* roślin polskich. Na przykład ze względu na częste porażenia plantacji kminku – *Carum carvi* grzybami i bakteriami, jego nasiona stają się nie przydatne do wysiewu. Szukając nowych dróg rozmnażania roślin z tego gatunku opracowano metodę mikrorozmnażania przez somatyczną embriogenezę. Polega ona na wytworzeniu w kalusie lub w komórkach hodowli zawieszinowej, czy hodowli zarodków, struktur komórkowych zwanych embrioidami, tzn. somatycznymi zarodkami, które powstają z komórek somatycznych i są zdolne dać początek nowej

roślinie. Embrioidy morfologicznie przypominają zarodki rozwijające się z zapłodnionej komórki jajowej. Początkowo mają one kształt owalny, następnie torpedowaty, sercowaty i liścieniowaty. Ich cechą znaną jest to, że tworzą równocześnie zawiązki korzenia i pędu, z których rozwijają się podobnie jak z zarodka całe rośliny. Somatyczna embriogeneza jest najszybszą metodą namnażania roślin *in vitro*.

Z kilku gramów kalusa można otrzymać około miliona zarodków. Aby zabezpieczyć je przed zbyt szybkim rozwojem opracowano metodę osłaniania embrioidów specjalną powłoką. Użytkowane są wtedy w formie kapsulek i nazywane sztucznymi nasionami, somatycznymi nasionami lub syntetycznymi nasionami. Obecnie trwają poszukiwania najlepszej powłoki, która dawałaby właściwą osłonę somatycznym zarodkom, zapewniała im właściwe przechowywanie i dalszy rozwój w glebie. Na przykład embrioidy lucerny zatopiane w alginianie wapniowym i przechowywane w formie kapsulek są zdolne do rozwoju w rośliny w 30 do 40%, selerów w 90 do 100% (9). Kapsułki z embrioidami kminku przechowywane przez 3 miesiące w temp. 4°C rozwijały się w rośliny w 60% (10). Tworzenie się embrioidów w kulturze *in vitro* stwierdzono po raz pierwszy w gatunkach rodziny baldaszkowatych – *Umbelliferae*, później u psiankowatych – *Solanaceae* i krzyżowych – *Cruciferae*. Obecnie można je otrzymać w gatunkach innych rodzin. W sytuacjach, gdy somatyczne zarodki nie wytwarzają się, bądź ich dalszy rozwój w rośliny jest nieprawidłowy do kapsulkowania mogą być użyte merystemy szczytowe lub boczne (11).

Interesujące badania na temat otrzymywania roślin haploidalnych z wykorzystaniem procesu androgenezy prowadzone są w ośrodku poznańskim. Przedmiotem badań są rośliny lecznicze: *Atropa belladonna* i *Hyoscyamus niger* (12,13), oraz inne z rodziny psiankowatych – *Solanaceae*.

Gatunki z klasy jednoliściennych, wytwarzające cebule, są na ogół łatwo rozmnażane *in vitro* przez organogenezę bezpośrednią, polegającą na wytworzeniu się pędów na eksplantacie, którym jest często fragment mięsistej łuski cebulowej pobranej wraz z piętą (14).

W hodowli *in vitro* możliwe jest również otrzymanie samych korzeni, które mogą być wynikiem bezpośredniej organogenezy (powstają z pierwotnego eksplantatu), bądź tworzą się na skutek pośredniej organogenezy w kalusie. Hodowle korzeni prowadzone są zwykle w związku z poszukiwaniem w nich substancji leczniczych gromadzonych w tych organach. Potrzeba przyspieszenia ich wzrostu *in vitro* spowodowała, że obecnie opracowano dla wielu gatunków metody hodowli, tzw. korzeni transformowanych genetycznie *hairy roots* (korzeni włóśnikowatych) otrzymywanych przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes*. Są one przykładem organów transgenicznych, tj. takich, do których wprowadzono obce DNA.

W Polsce niektóre tematy dotyczące mikro rozmnażania roślin leczniczych realizowane są na Wydziałach Farmaceutycznych w Warszawie i w Poznaniu we współpracy z ośrodkami zagranicznymi, np. z Instytutem Nauk Fizjologicznych Akademii Nauk w Moskwie oraz z Wydziałem Biologii Uniwersytetu w Düsseldorfie.

Zwiększone zapotrzebowanie na rośliny lecznicze z jednej strony i kurczące się ich zasoby naturalne z drugiej, będą niewątpliwie stymulowały dalszy rozwój metod biotechnologicznych, ukierunkowany na szybkie rozmnażanie roślin *in vitro*. Rozwój i stosowanie najnowszych metod biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem inżynierii genetycznej pozwoli w przyszłości uzyskać wartościowy surowiec roślinny o zwiększonej masie i zawartości cennych składników.

Literatura

1. Zenkteler E., (1984), w: Hodowla komórek i tkanek roślinnych (red. M. Zenkteler), PWN, Warszawa, 111–208.
2. Bajaj Y. P. S., Furmanowa M., Olszowska O., (1988), in: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants I (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 60–103.
3. Furmanowa M., Olszowska O., (1987), Wiadomości Zielarskie, 29, 15–17.

4. Furmanowa M., Olszowska O., (1992), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 19, High-Tech and Micropropagation III (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 230-243.
5. Furmanowa M., Józefowicz J., Olędzka H., Pietrosiuk A., (1991), VI konferencja naukowa „Roślinne kultury tkankowe w Polsce”, Radzików, streszczenia konferencji, 32.
6. Olszowska O., Furmanowa M., (1992), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 24, Medicinal and Aromatic Plants V (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (in press).
7. Furmanowa M., Rapczewska L., (1992), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 21, Medicinal and Aromatic Plants IV (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 18-33.
8. Furmanowa M., Guzewska J., (1989), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 7, Medicinal and Aromatic Plants II (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 162-184.
9. Redenbaugh K., Paasch B. D., Nichol J. W., Kossler M. E., Viss P. R., Walker K. A., (1986), *Biotechnology*, 4, 797-801.
10. Furmanowa M., Sowińska D., Pietrosiuk A., (1991), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 15, Medicinal and Aromatic Plants III (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 176-192.
11. Mathur J., Ahuja P. S., Lal N., Mathur K., (1989), *Plant Science*, 60, 111-116.
12. Zenkteler M., (1971), *Experientia*, 27, 1087.
13. Wesołowska M., Skrzypczak L., (1985), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 54, 107-113.
14. Furmanowa M., Olędzka H., (1990), in: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 5, Ornamental Species (eds.: P. V. Ammirato, D. R. Evans, W. R. Sharp, Y. P. S. Bajaj), McGraw-Hill Publ. Com., New York, Toronto, 800-819.

Micropropagation of medicinal plants

Summary

Various methods for the micropropagation of medicinal plants are discussed with reference to specific examples. These are: *Catharanthus roseus*, *Coluria geoides*, *Bergenia crassifolia*, *Dioscorea deltoidea*, *Carum carvi*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*. Method of transformed hairy roots culture is also presented.

Adres dla korespondencji:

Mirosława Furmanowa, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa.