

Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*

BARBARA THIEM*, MAŁGORZATA KIKOWSKA

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
ul. Św. Marii Magdaleny 14
61-861 Poznań

*autor, do którego należy kierować korespondencję; e-mail: bthiem@ump.edu.pl

Streszczenie

Hodowla kultur tkankowych może być wydajną metodą szybkiego, klonalnego mnożenia wartościowych roślin. Mikrorozmnażanie z istniejących merystemów umożliwia otrzymanie dużej liczby jednorodnych sadzonek o wysokiej jakości. Zgodnie z wymaganiami ESCOP, specyfiki ziołowe powinny być otrzymywane ze standaryzowanego surowca. Dlatego, w świetle nowych zaleceń GAP i GMP, istnieje konieczność oceny kultur pędowych i roślin pochodzących z kultur *in vitro*, co przyczyni się do podniesienia jakości przyszłych surowców. Kultury roślin leczniczych w kontrolowanych warunkach *in vitro* wydają się dobrą metodą produkcji sadzonek, które mogą zostać opatrzone certyfikatem. Dotyczy to „klasycznej” techniki mikrorozmnażania, gdzie spełnione są wszystkie kryteria wymagane w opracowanym protokole. Jednakże niekiedy w roślinnych kulturach tkankowych obserwuje się tzw. zmienność somaklonalną, która w efekcie może prowadzić do zmian zawartości pożądaných związków i tym samym obniżyć jakość surowca. Aby tego uniknąć, każdy etap mikropropagacji powinien być kontrolowany, a namnożone *in vitro* roślinki oceniane w porównaniu z roślinami wyjściowymi. W przypadku roślin leczniczych szczególnie ważne jest zachowanie stabilności genetycznej i otrzymanie jednorodnego materiału. Także problem jakości pracy w laboratorium kultur tkankowych wymaga naszej stałej kontroli. Z tego powodu kultury pędowe mogą być poddane pierwszej standaryzacji już na poziomie kultur *in vitro*: ocenie morfologicznej, fizjologicznej, cytogenetycznej, biochemicznej lub fitochemicznej. Czystość mikrobiologiczna roślin mnożonych *in vitro* również jest wymagana, zgodnie z obowiązującymi standardami. Różnorodna ocena roślin przeprowadzana w warunkach kultur *in vitro* wskazuje, że odpowiednio opracowane protokoły mikrorozmnażania mogą być stosowane do szybkiego mnożenia jednorodnych roślin z przeznaczeniem do upraw. Kontrolowane uprawy roślin leczniczych nabierają w ostatnich latach znaczenia z uwagi na wzrost wymagań dotyczących udokumentowanej jakości surowca zielarskiego.

Słowa kluczowe: GMP, GAP, ocena jakości, markery biologiczne, certyfikowane mikrosadzonki, metabolity wtórne

Jakość jest pojęciem trudnym do zdefiniowania. Na przestrzeni wieków podejmowano liczne próby stworzenia uniwersalnej definicji [1]. Platon określił jakość jako *pewien stopień doskonałości*. Tworząc łaciński termin filozoficzny greckiego pojęcia, Cyceon wprowadził słowo *qualitas*, które przeszło do niektórych języków romańskich i germańskich. Natomiast bardziej współczesne podejście do pojęcia jakości prezentuje Crosby, stwierdzając, że *jakość to zgodność z wymaganiami*, wobec czego standard jakości nie pozostawia miejsca na jego wartościowanie. Uchodzący również za autorytet w dziedzinie jakości Deming definiuje to pojęcie jako *przewidywany stopień jednorodności i niezawodności przy możliwie niskich kosztach i dopasowaniu do wymagań rynku*. Z kolei według Feigenbauma *jakość to zbiorcza charakterystyka produktu i serwisu z uwzględnieniem marketingu, projektu, wykonania i utrzymywania, która powoduje, że dany produkt i serwis spełniają oczekiwania użytkownika*. Według normy PN-EN ISO 9000:2001 dotyczącej systemu zarządzania jakością *jakość to stopień, w jakim zbiór inherentnych właściwości spełnia kryteria*. Jakość produktu jest związana z takimi jego właściwościami handlowymi jak stopień zgodności ze wzorcem lub wyspecyfikowanymi wymaganiami, widoczność zespołu cech istotnych dla produktu i usatysfakcjonowanie nabywcy [1].

Rośliny lecznicze odgrywają istotną rolę zarówno w tradycyjnej, jak i nowoczesnej fitoterapii. Współczesne leczenie oferuje duży asortyment leków pochodzenia roślinnego o szerokim spektrum działania farmakologicznego. Surowce roślinne wykorzystuje się do izolacji jednorodnych związków, bądź jako składniki specyfików ziołowych. Wiele gatunków rzadkich, niedostępnych lub zagrożonych wyginięciem roślin leczniczych może stać się łatwo dostępnym surowcem dla przemysłu farmaceutycznego dzięki metodzie rozmnażania klonalnego w kulturach *in vitro* [2] (ryc. 1).

Metoda mikrorozmnażania roślin leczniczych zalecana jest dla gatunków:

- które nie zawiązują nasion lub tworzą nieliczne nasiona najczęściej charakteryzujące się niską żywotnością i słabą siłą kiełkowania;
- produkujących drogie nasiona;
- rzadkich, endemicznych lub chronionych;
- pochodzących z innej strefy klimatycznej, gdzie są stosowane w medycynie tradycyjnej, a mogą być aklimatyzowane w krajowych warunkach.

W ostatnich latach obserwuje się intensyfikację upraw polowych roślin leczniczych, ale nadal dużą część gatunków pozyskuje się ze stanu naturalnego, czego rezultatem jest stopniowe kurczenie się zasobów naturalnych. Pierwsze próby zakładania plantacji roślin leczniczych podejmowano w końcu XIX w. Przed II wojną światową cały obszar upraw polowych wynosił 500 ha. Hodowano przede wszystkim miętę, rumianek, walerianę i naparstnicę. Obecnie wynosi on 20 000 ha, a hoduje się 70 gatunków roślin leczniczych i aromatycznych [3].



Rycina 1. Etapy procesu mikrorozmnażania roślin na przykładzie *Eryngium planum* L.

Konwencjonalne rozmnażanie roślin przebiega bardzo powoli, a w przypadku wielu gatunków jest nieefektywne. Natomiast w wyniku mikrorozmnażania z wyselekcjonowanych roślin elitarnych można uzyskać w krótkim czasie dużą liczbę genetycznie jednorodnych, wartościowych mikrosadzonek [2, 4]. Taki wyrówna-

ny materiał rozmnożeniowy może znaleźć zastosowanie przy zakładaniu plantacji, w tzw. uprawach kontrolowanych. Otrzymanie sadzonek wyrównanych pod względem genetycznym z kultur *in vitro* jest gwarantowane przy zastosowaniu eksplantatów zawierających merystemy wierzchołkowe i pąki boczne, rzadziej z zawiązków liści i młodych pąków kwiatowych [4, 5].

Ze względu na coraz większe wymagania względem jakości surowców zielarskich należy zapewnić odpowiednią jakość uzyskanych sadzonek. Przy odpowiednio dobranej i przestrzeganej metodzie rośliny z kultur *in vitro* będą genetycznie jednorodne i tożsame z rośliną rodzicielską, a uzyskany z nich surowiec leczniczy jakościowo wyrównany. Nowe przepisy GAP (Good Agriculture Practice) i GMP (Good Manufacture Practice) narzucają konieczność szerokiej oceny sadzonek pochodzących z kultur *in vitro* [6, 7]. Ocenie podlega również cały proces wytwarzania mikrosadzonek, który powinien być zgodny z wymogami Dobrej Praktyki Wytwarzania [8]. Taka szeroka kontrola przyczyni się do zapewnienia jakości, a także może podnieść wartość przyszyłych surowców zielarskich. Jest to ważne zagadnienie podkreślane przez ESCOP (European Scientific Cooperation for Phytotherapy) i komisje farmakopealne.

Wizualna ocena jakości końcowego produktu mikrorozmnażania jest niewystarczająca. Dobrze wyglądająca mikrosadzonka nie gwarantuje otrzymania z niej wysokiej jakości rośliny. Należy więc przyjąć, że bez względu na rodzaj zastosowanej metody mikrorozmnażania istnieje ryzyko pojawienia się zmienności w roślinnych kulturach *in vitro*. Zmiany powstałe w czasie prowadzenia kultur mogą być wynikiem mutacji i mają podłoże genetyczne (są trwałe), mieć charakter fizjologiczny bądź wynikać z założenia kultur z genetycznie zróżnicowanych eksplantatów. Zmienność występująca podczas mikrorozmnażania nie jest zjawiskiem pożądanym. Przy prawidłowym prowadzeniu kultur pędowych w procesie mikrorozmnażania występowanie zmienności genetycznej (somaklonalnej) nie jest częstym zjawiskiem. Najczęściej występująca zmienność jest przejściowa (zmienność epigenetyczna lub fizjologiczna) [9]. Rośliny rozmnażane z kultur pędów i kultur merystemów charakteryzują się dużą stabilnością genetyczną. Natomiast regeneracja pędów przybyszowych, szczególnie za pośrednictwem kalusa, jest często powodem występowania genetycznej niestabilności wśród regenerantów. Zmienność taka może pojawiać się jako odpowiedź rośliny na stres narzucony w warunkach kultur *in vitro*. Ścisłe przestrzeganie reguł prowadzenia kultur pozwala na utrzymanie stabilności genetycznej mikrosadzonek.

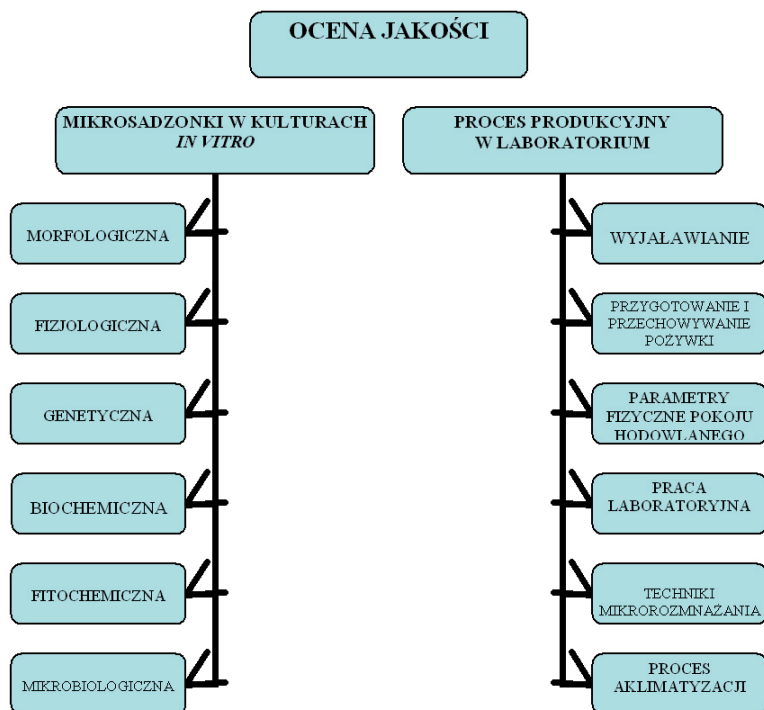
Czynnikami wpływającymi na poziom zmienności somaklonalnej w kulturach *in vitro* są:

- genotyp rośliny donorowej;
- wybór eksplantatu;
- sposób i warunki prowadzenia kultury;
- obecność auksyn i cytokinin i ich stężenie w pożywce;
- ilość pasaży.

Możliwe jest zminimalizowanie ryzyka pojawienia się zmienności poprzez zakładanie kultur z kilku merystemów wierzchołkowych i prowadzenie kultury

pędów potomnych jako oddzielnych populacji do czasu kontroli tożsamości genetycznej, rozmnażanie tylko przez pąki kątowe, usuwanie pędów wyrastających z podstawy eksplantatu, z liści stykających się z pożywką, usuwanie pędów z tworzącego się kalusa oraz zalecanie prowadzenia mikrozmnażania do 15 pasaży. Wskazane jest stosowanie jak najniższych stężeń regulatorów wzrostu i rozwoju roślin.

Konieczna jest zatem kontrola produkowanego materiału *in vitro* w celu eliminacji ryzyka obniżenia zawartości lub utraty pożądaných związków czynnych w przyszłych surowcach roślinnych (ryc. 2). Według nowych przepisów mikrosadzonki powinny być standaryzowane, a zatem podlegać ocenie morfologicznej, fizjologicznej, biochemicznej i genetycznej [10]. O wartości użytkowej sadzonek przesądza wierność fenotypowa i tożsamość genetyczna. Ocena mikrobiologiczna zawiera w sobie informację o zdrowotności materiału roślinnego. Z kolei ocena biochemiczna, a szczególnie fitochemiczna jest konieczna do określenia wartości przyszłego surowca farmaceutycznego. Doskonalenie metod oceny roślin wiążące się z doбором markerów wykazujących jakość rozmnażanych *in vitro* roślin było tematem międzynarodowego sympozjum pt. „Metody i markery zapewniające jakość w mikropropagacji” zorganizowanej w 1999 r. w Cork (Irlandia).



Rycina 2. Ocena jakości mikrosadzonek w kulturach *in vitro* i procesu produkcyjnego w laboratorium

Mikrosadzonki poddaje się **ocenie morfologicznej**. Polega ona na weryfikacji botanicznej roślin i kontroli, czy produkowane sadzonki są *true-to-type* pod względem fenotypu poprzez porównanie pokroju rośliny oraz prawidłowości kształtu organów z roślinami kontrolnymi (wyprowadzonych bezpośrednio z nasion). Ocenie podlega także liczba pędów zdolnych do ukorzenienia.

Ocenę kondycji fizjologicznej mikrosadzonek prowadzi się na podstawie zdolności do przeprowadzania procesu fotosyntezy i prawidłowej pracy aparatów szparkowych. Istotnych informacji na temat kondycji fizjologicznej roślin dostarczają analizy dojrzałości tkanek okrywających i przewodzących rośliny oraz status wodny komórek. Optymalna wydajność procesów fizjologicznych mikrosadzonek wyraża się zdolnością do postępującego wzrostu, szybkiego i obfitego ukorzeniania, przetrwania procesu aklimatyzacji do warunków poza szkłem [4, 11]. Sprawność przechodzenia roślin z metabolizmu heterotroficznego, dominującego w kulturach *in vitro*, do autotroficznego można podnieść poprzez obniżanie zawartości cukru w pożywce w czasie ostatniego pasażu. Zaleca się prowadzenie ukorzeniania roślin poza szkłem. W procesie aklimatyzacji ważna jest niekiedy biotyżacja, czyli zasiedlanie kultur bakteriami symbiotycznymi, zabezpieczającymi roślinę przed patogenami glebowymi po wsadzeniu do podłoża. Rośliny otrzymane w kulturach *in vitro* po przeniesieniu do warunków *in vivo* powinny funkcjonować tak samo jak rośliny otrzymywane tradycyjnymi metodami rozmnażania. Dobrą kondycję fizjologiczną roślin można uzyskać dzięki lepszemu kontrolowaniu warunków fizycznych i chemicznych kultury, ze szczególnym uwzględnieniem ostatniego pasażu.

Ocena cytogenetyczna mikrosadzonek związana jest ze zmiennością somaklonalną występującą w kulturach *in vitro*, wynikającą głównie ze zmian liczby pojedynczych chromosomów bądź ze zróżnicowaniem poziomu ploidalności. Nawet jeśli w roślinach wyprowadzonych z kultur *in vitro* nie obserwuje się zmian fenotypowych sugerujących wyżej wspomniane zjawisko, to ocena cytogenetyczna może wykazać odchylenia od wzorca gatunkowego. Cytometria przepływową to szybka, prosta i precyzyjna metoda pomiaru zawartości jądrowego DNA wykorzystywana w badaniach genetycznej stabilności i jednorodności roślin zregenerowanych *in vitro* [12-15], szczególnie tych produkowanych na dużą skalę. Analizy cytometryczne wykonywane są rutynowo w przypadku mikrosadzonek przeznaczonych na eksport, które powinny być opatrzone certyfikatem stałości genetycznej [Śliwińska, informacja ustna]. Spośród technik molekularnych stosunkowo tania i prosta metoda pozwalająca na wykrycie zmienności somaklonalnej, a przez to wykorzystywaną do analizy stabilności genetycznej wielu gatunków roślin jest metoda RAPD, wykorzystująca losowo amplifikowany polimorficzny DNA [16-18].

Ocena biochemiczna roślin pochodzących z kultur *in vitro* polega na analizie izoenzymów lub białek, a **ocena fitochemiczna** – głównych metabolitów wtórnych. Jakość roślin leczniczych rozmnażanych *in vitro* jako przyszłego surowca farmaceutycznego powinna być oceniana przede wszystkim pod względem zawartości związków biologicznie czynnych [18, 19].

Ocena fitochemiczna może być przeprowadzona już na etapie kultur *in vitro*. Celem oceny jest sprawdzenie, czy w kulturze *in vitro* zachodzi biosynteza głównych związków odpowiedzialnych za działanie farmakologiczne surowca. Metodą jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej można wstępnie kontrolować, czy w hodowanych organach i zregenerowanych roślinach zachowana została zdolność do biosyntezy wybranych metabolitów wtórnych. Metodami HPLC i GC-MS monitorowana może być także zawartość metabolitów, a w niektórych przypadkach brak toksycznych związków w kulturach [20-22].

Przed założeniem uprawy polowej rośliny leczniczej konieczne jest ustalenie profilu chemicznego mikrosadzonek oraz umieszczenie informacji o chemotypie razem z nazwą botaniczną rośliny. Informacja ta jest niezbędna ze względu na fakt, iż warunki panujące w kulturach *in vitro* sprzyjają powstaniu roślin różniących się zawartością występujących w nich metabolitów wtórnych oraz zmianami w składzie chemicznym produktu.

Ocena mikrobiologiczna w kulturach tkanek roślinnych jest jednym z wyznaczników techniki *in vitro* stosowanej w pracy badawczej i w produkcji [23, 24]. Należy dążyć do skutecznej eliminacji bakterii patogenicznych dla roślin i dla ludzi oraz do ograniczenia ilości bakterii wywierających negatywny wpływ na jakość kultur podczas produkcji. Większość koloni bakterii bytujących wewnątrz tkanek roślinnych jest wprowadzana z inicjalnym materiałem roślinnym, głównie z powodu niewłaściwej procedury dezynfekcji powierzchniowej eksplantatów, a część ze środowiska laboratoryjnego. Niezwykle kłopotliwą komplikacją jest utajony wzrost endofitów w tkankach eksplantatów. Eliminowanie drobnoustrojów (głównie bakterii, wiroidów, wirusów, fitoplazm) może być prowadzony podczas pięciu stadiów cyklu mikrorozmnażania: od prekultury, poprzez stabilizację eksplantatów, namnażanie, przygotowanie kultur do wzrostu *ex vitro* i aklimatyzacji [25]. Monitoring obecności bakterii wykonuje się dzięki wykorzystaniu specjalnych pożywek Bacteria Screening Medium SIGMA albo pożywek mineralno-glukozowych wzbogacanych ekstraktem drożdżowym, hydrolizatem kazeiny lub peptonem [26]. W ostatnich latach do detekcji i identyfikacji patogenów obligatoryjnych w materiale uzyskanym z kultur *in vitro*, ze względu na precyzyjność technik, szybkość i wiarygodność wyników stosuje się metody molekularne [26]. Do metod wykrywania i identyfikacji fitoplazm, ale także innych drobnoustrojów, należą przede wszystkim metody molekularne oparte na analizie DNA, w szczególności reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) z zastosowaniem odpowiednich starterów [27]. Przełom w monitorowaniu roślin rozmnażanych w kulturach *in vitro* nastąpił z chwilą opracowania markerów RFLP opartych na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA. Metoda ta umożliwia wykrycie w komórkach roślinnych obcego DNA, ale głównymi minusami metody pozostają duża ilość materiału roślinnego niezbędna do badań oraz wysoki koszt analizy. Spośród metod wykrywania już zidentyfikowanych endofitów na uwagę zasługują test ELISA oraz FISH. Należy pamiętać, że o czystości mikrobiologicznej kultur *in vitro* decydują warunki kontrolowanego wzrostu i rozwoju roślin donorowych ze szczególnym uwzględnieniem

niem ostrego reżimu fitosanitarnego, staranne odkażanie powierzchniowe lub/i wewnętrzne eksplantatów inicjalnych, zachowanie wysokich standardów fitosanitarnych w czasie prowadzenia kultur oraz wspomniane już testowanie kultur na obecność mikroorganizmów [25].

Procedura wytwarzania mikrosadzonek powinna być zgodna z dokumentacją opracowanego protokołu. **Ocena procesu produkcji** mikrosadzonek w laboratorium dotyczy wielu aspektów odnoszących się do materiału roślinnego oraz parametrów chemicznych i fizycznych prowadzenia kultur [7] (ryc. 2). Rośliny donorowe w postaci wyselekcjonowanych odmian i linii muszą charakteryzować się pełną zdrowotnością. Do najczęściej wymienianych czynników wpływających na kondycję roślin rodzicielskich należą wiek rośliny i warunki kontrolowanego wzrostu i rozwoju roślin: intensywność światła, optymalna wartość temperatury i wilgotności względnej powietrza, traktowanie substancjami wzrostowymi. Ważne jest stosowanie właściwych zabiegów agrotechnicznych i niezbędnej ochrony chemicznej. Istotny jest nie tylko prawidłowy wybór eksplantatu (merystemy wierzchołkowe, pąki boczne, zawiązki liści, młode pąki kwiatowe) pochodzącego od rośliny donorowej, ale także jego wielkość i usytuowanie na pożywce. Zbyt duże zagęszczenie eksplantatów w pojemnikach kultur może bardzo wpływać na jakość produktu końcowego. Materiał biologiczny przeznaczony do kultur *in vitro* poddaje się odkażaniu powierzchniowemu. Zarówno wybór odpowiedniego środka odkażającego, jak i czasu ekspozycji na substancje aktywne powinny zostać dobrane eksperymentalnie. Należy zwrócić uwagę na sposób odkażania narzędzi i pojemników do kultur we właściwej temperaturze lub/i przy właściwym ciśnieniu. Właściwe wypełnienie komory autoklawu parą wodną gwarantuje osiągnięcie pożądanej temperatury i jego prawidłowe funkcjonowanie. Szkło i narzędzia poddaje się także „suchej sterylizacji” w cieplarni. Dobór komponentów pożywki, techniki przygotowania oraz sposób i czas przechowywania podłoża do kultur *in vitro* wpływają na wzrost i rozwój roślin. Kompozycja składników chemicznych pożywki dotyczy wyboru przede wszystkim odpowiedniej kombinacji egzogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin i ich „bezpiecznego” stężenia. Makro- i mikroskładniki powinny być przechowywane w stężonych roztworach, w obniżonej temperaturze (4°C). Przy ustalaniu kwasowości pożywki należy zwrócić uwagę, czy pH-metr jest prawidłowo wykalibrowany i czy pomiar wykonywany jest w odpowiedniej temperaturze. Mikropropagację przeprowadza się w kabinie z laminarnym przepływem powietrza, w której monitorowane muszą być takie parametry jak prawidłowa szybkość pracy wentylatora, czas naświetlania lampami UV, dezynfekcja powierzchni roboczych i prawidłowy stan filtra. Także warunki fizyczne panujące w pokoju hodowlanym muszą zostać określone: optymalna temperatura, wysoka wilgotność względna powietrza oraz intensywność oświetlenia i fotoperiod. Ostatnim, często najtrudniejszym etapem wprowadzenia roślin leczniczych pochodzących z kultur *in vitro* do gruntu jest aklimatyzacja, czyli stopniowe dostosowywanie warunków wzrostu i rozwoju roślin do warunków *ex vitro* [11]. Podsumowując omówienie oceny jakości procesu produkcyjnego w labora-

torium tkanek *in vitro*, należy wskazać na konieczność doboru wykwalifikowanej kadry pracowniczej przestrzegającej pełnej aseptyki laboratoryjnej [28].

Roślinne kultury *in vitro* można rozpatrywać także od strony ochrony gatunkowej. Tylko mikrosadzonki po odpowiedniej ocenie, wiążącej się z właściwym doбором markerów mogą zostać reintrodukowane na stanowiska naturalne i wprowadzone do ogrodów botanicznych, wzbogacając bank genów. Przechowywanie tkanek merystematycznych pochodzących z jakościowo ocenianych kultur pędowych i somatycznych nasion może być formą zachowania *ex situ* rzadkich i ginących gatunków w warunkach *in vitro*. Do tego celu służy krioprezerwacja i techniki długoterminowego przechowywania tkanek merystematycznych w obniżonej temperaturze i przy minimalnym oświetleniu [12]. Podobne metody są również wykorzystywane w celu zachowania plazmy zarodkowej szeregu gatunków ważnych ekonomicznie, w tym leczniczych, i tym samym przyczyniają się do zachowania bioróżnorodności [10]. Zwykle plazma zarodkowa przechowywana jest w formie nasion, jednakże gdy kiełkuje niski procent nasion, zachowywanie organów wegetatywnych *in vitro* może być alternatywą dla ochrony gatunkowej [29].

Ostatnio upowszechnia się tendencja do certyfikowania sadzonek produkowanych w laboratoriach *in vitro* [30]. Kwalifikowany materiał rozmnożeniowy do celów komercyjnych uzyskiwany metodą mikrorozmnażania powinien być stały genetycznie i wolny od patogenów, co może dokumentować **certyfikat zdrowotności sadzonek**. Certyfikat powinien obejmować zarówno informacje o wysokiej jakości produktu rozmnażania stwierdzonej właściwie dobranymi markerami, jak i procesie produkcyjnym, który podlega standardom międzynarodowym. Sadzonki takie odpowiadać powinny jakościowym normom genotypu i znajdować się w prawidłowej kondycji fizjologicznej, gwarantującej adaptację do dalszego rozwoju *in vivo*. Dodatkowo, w przypadku roślin leczniczych, ocena fitochemiczna powinna wykazywać w mikrosadzonkach zdolność do biosyntezy związków biologicznie czynnych na poziomie porównywalnym z roślinami uzyskanymi metodami klasycznymi. Aby zagwarantować jakość przyszłego surowca leczniczego, już na etapie kultur *in vitro* mikrosadzonki można poddać szerokiej ocenie (ryc. 2).

Włączenie roślinnych kultur tkankowych w tok zakładania nowoczesnych, kontrolowanych upraw polowych przyczyni się do podniesienia jakości roślin leczniczych i pozyskiwanych z nich preparatów roślinnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Skrzypek E. Jakość i efektywność. Wydawnictwo UMCS Lublin 2002.
2. Wawrosch Ch. Plant biotechnology for propagation, conservation and quality improvement of medicinal plants. Acta Biochimica Polonica 2008, 55:41 Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH, Kraków 17-19.10.2008.
3. Seidler-Łożykowska K. Significant impact of plant breeding on the quality of medicinal plants raw material. Herba Pol 2001; 49:61.
4. Orlikowska T. Sposoby poprawienia jakości mikrosadzonek. Konferencja: Rozmnażanie roślin *in vitro*. Skierniewice 25.04.2001:40-4.

5. Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.4, Medicinal and Aromatic Plants I. Berlin-Heidelberg-New York:60-103.
6. Doblhoff-Dier O, Bliem R. Quality control and assurance from the development to the production of biopharmaceuticals. *Bibtech* 1999; 17:266-70.
7. European commission: EudraLex: The rules governing medicinal products in the European Union, vol. 4: Good Manufacturing Practice. Medicinal products for human and veterinary use.2007 ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticala/eudralex/vol4_en.htm
8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 października 2006 r. w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania. Dz.U.06.194.1436 www.mz.gov.pl
9. Borkowska B. Czy zmienność musi towarzyszyć mikrorozmnażaniu? Roślinne kultury *in vitro* w badaniach podstawowych i stosowanych. VIII Ogólnopolska Konferencja Polskiej Sekcji Kultur *In Vitro* PTB. Kraków 25–27.08.1997:10.
10. Ashmore SE. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome 1997:1-67.
11. Borkowska B. Fizjologiczna ocena roślin z kultur *in vitro*. *Biotechnologia* 2001; 2:133-8.
12. Thiem B, Śliwińska E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. *Plant Sci* 2003; 164:129-34.
13. Śliwińska E, Thiem B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro*. *Biol Plant* 2007; 51: 556-8.
14. Makowczyńska J, Andrzejewska-Golec E, Śliwińska E. Nuclear DNA content in different plant materials of *Plantago asiatica* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2008; 94:65-71.
15. Shiba T, Mii M. Visual selection and maintenance of the cell lines with high plant regeneration ability and low ploidy level in *Dianthus acicularis* by monitoring with flow cytometry analysis. *Plant Cell Rep* 2005; 24:572-80.
16. Rout GR, Das G. An assessment of genetic integrity of micropropagated plants of *Plumbago zeylanica* by RAPD markers. *Biol Plant* 2002; 45:27-32.
17. Gangopadhyay G, Basu Gangopadhyay S, Poddar R, Gupta S, Mukherjee KK. Micropropagation of *Tectona grandis*: assessment of genetic fidelity. Brief communication. *Biol Plant* 2003; 46:459-61.
18. Lattoo SK, Bamotra S, Sapru Dahr R, Khan S, Dhar AK. Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity of *in vitro* derived plants of *Chlorophytum arundinaceum* Baker – an endangered medicinal herb. *Plant Cell Rep* 2006; 25:499-506.
19. Thiem B. Techniki biotechnologiczne zastosowane do oceny i zachowania wartościowych cech wybranych roślin leczniczych. Praca habilitacyjna, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2003.
20. Budzianowski J, Mrozowska M, Wesołowska M. Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and *in vitro* culture. *Phytochemistry* 2005; 66:1033-9.
21. Wawrosch Ch, Kopp B, Wiederfeld H. Permanent monitoring of pyrrolizidine alkaloid content in micropropagated *Tussilago farfara* L.: A tool to fulfill statutory demands for the quality of coltsfoot in Austria and Germany. *Acta Hort* 2000; 530:469-72.
22. Kalembe D, Thiem B. Constituents of essential oils of four micropropagated *Solidago* species. *Flavour Fragr J* 2004; 19:40-3.
23. Leifert C, Woodward S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1998; 52:83-8.
24. Orlikowska T, Zawadzka M. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. *Biotechnologia* 2006; 4:64-77.
25. Zenktele E. Materiał rozmnożeniowy o wysokiej jakości. W: Malepszy S. (red.) *Biotechnologia roślin*. Warszawa 2007:273-91.
26. Narayanasamy P. Detection of Microbial Pathogens by Nucleic Acid-Based Techniques. *Molecular Techniques for Detection of Microbial Pathogens Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Microbial Plant Pathogens*. Springer 2008; 1:32-85.
27. Gabryszewska E, Kamińska M. Technika *in vitro* – metoda uwalniania roślin od fitoplazm czy też metoda rozmnażania fitoplazm? Konferencja: Rozmnażanie roślin *in vitro*. Skierniewice 25.04.2001:29-34.
28. Debergh P. Quality issues in a tissue culture laboratory. In: Altman A.(ed.): *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Kluwer Academic Publisher 1999:625-8.

29. Cassells AC, Walsh C, Belin M, Cambornac M, Robin JR, Lubrano C. Establishment of a plantation from micropropagated *Arnica chamissonis* a pharmaceutical substitute for the endangered *A. montana*, Plant Cell Tiss Org Cult 1999; 56:139-44.
30. Linde van der PCG. Certified plants from tissue culture. In: Cassells A.C.(ed.): Proceedings of the International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation. 24-27 August 1999, Cork, Ireland. Acta Hort 2000; 530:93-9.

THE ASSURANCE OF MEDICINAL PLANTS QUALITY PROPAGATED IN *IN VITRO* CULTURES

BARBARA THIEM*, MAŁGORZATA KIKOWSKA

Department of Pharmaceutical Botany and Plant Biotechnology
Poznań University of Medical Sciences
Św. Marii Magdaleny 14
61-861 Poznań, Poland

*corresponding author: e-mail: bthiem@ump.edu.pl

S u m m a r y

Plant tissue cultures offer an effective way for a large scale clonal multiplication of superior plants, through pre-existing meristems, with high genetic uniformity and high quality. According to ESCOP, herbal drugs should be obtained from standardized raw material. In the light of new GMP and GAP recommendations it has become necessary to assess shoot cultures and *in vitro*-derived plants, which may increase the quality of future herbal raw materials. The culture of medicinal plants in controlled *in vitro* conditions seems to be the best method of certified plantlets production. Especially the "classical" micropropagation techniques are of interest when certain criteria are fulfilled. However, somaclonal variation is observed in plant tissue culture which can lead to changes in content of desired compounds and thus decrease the quality of the plant material. In order to avoid it, each stage of micropropagation should be controlled and plantlets should be assessed in comparison to donor plants. Confirmation of genetic stability is of particular importance in medicinal plants. Quality issues in a tissue culture laboratory also require our special attention.

For this reason, the shoot cultures can be evaluated morphologically, cytogenetically, physiologically, biochemically and phytochemically. According to modern standards, the microbiological quality of micropropagated plants is also necessary. It has been showed that *in vitro* cultures can be evaluated by biological markers and that the first standardization of the plants at the level of *in vitro* culture is possible.

Varied evaluation of micropropagated plants has showed that appropriate protocols of *in vitro* propagation can be used for a rapid multiplication of superior plant for establishing controlled, ecological cultivations. The controlled cultivation of medicinal plants for the production of herbal medicinal products has gained in importance in recent years due to increased requirements as regards quality and documentation.

Key words: GMP, GAP, quality assurance, biological markers, certified plantlets, secondary metabolites