

IN SITU IN EX SITU OHRANJANJE NARAVNIH IZVOROV ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN V SLOVENIJI

Dea Baričević,¹ Alenka Zupancič², Maša Eržen-Vodenik², Andrej Seliškar³

¹ Biotehniška fakulteta, Ljubljana

² M-KŽK Kmetijstvo Kranj, LFVB, 4000 Kranj

³ Znanstveno raziskovalni center SAZU, Biološki inštitut, Ljubljana

IZVLEČEK

Zdravilne in aromatične rastline so v Sloveniji postale zanimive tako z vidika njihovega pridelovanja kot z vidika trženja proizvodov na njihovi osnovi. Zavedajoč se problematike degradacije ekosistemov in nevarnosti izgubljanja biološke raznovrstnosti, ki je osnova selekcijskega in žlahtniteljskega dela v prihodnosti, je Slovenski sklad za naravo nedavno ratificiral Resolucijo o trajnostnem razvoju podeželja in ohranjanju biološke raznovrstnosti v Sloveniji, v kateri je poudarjena tudi skrb za varstvo zdravilnih in aromatičnih rastlin *in situ*. V letu 1995 in 1996 je bila uradno priznana Nacionalna zbirka (genska banka) zdravilnih in aromatičnih rastlin, v kateri vzdržujemo okoli 650 akcesij. Izmed teh so bile nekatere kemijsko in/ali biološko ovrednotene. *In situ* in *ex situ* strategija ohranjanja naravnih izvorov v okviru genske banke zdravilnih in aromatičnih rastlin je predvidena v 4 stopnjah: inventarizacija naravnih izvorov, aktivno ohranjanje, zmerna in smotrna raba ter preprečevanje masovnega izkoriščanja naravnih izvorov. Da bi omogočili hitro ter ekonomično razmnoževanje in v prihodnosti pridobili klonski material zanimivih akcesij zdravilnih in aromatičnih rastlin, smo zaradi njihove velike variabilnosti v morfoloških in kemotaksonomskih lastnostih uvedli v okviru genske banke tehniko tkivnega razmnoževanja. Pri artičoki (*Cynara scolymus* L.) je bila uporabljena metoda mikropropagacije prek rastnih vršičkov, pri dobri misli (*Origanum vulgare* L.), materini dušici (*Thymus vulgaris* L.), žajblju (*Salvia officinalis* L.) in šentjanževki (*Hypericum perforatum* L.) pa nodalno segmentiranje aksilarnih poganjkov. Sterilizacija rastlinskega materiala se je izkazala za eno najtežavnejših stopenj mikropropagacije proučevanih zdravilnih in aromatičnih rastlin, saj se akcesije znotraj rastlinske vrste individualno odzivajo na jakost dezinficiensa in na čas razkuževanja.

Rad je izložen na 104. Mednarodnem znanstvenem simpoziju "Kvalitetnim kultivarom i sjemenom u Evropu III" održanom od 16. do 19. veljače 1995. godine u Opatiji

1 UVOD

Zavedajoč se problematike degradacije ekosistemov v svetu intenzivno uvajajo sanacijske znanstveno raziskovalne programe, ki popisujejo, raziskujejo in iščejo možnosti za racionalno rabo naravnih izvorov zdravilnih in aromatičnih rastlin. Farmacevtske tovarne in poslovneži razvitega sveta so se zavedli aktualnosti ohranitve biološke raznovrstnosti zdravilnih rastlin ob spoznanju, da predstavljajo naravni izvori v prihodnosti možnost odkrivanja novih proizvodov v farmacevtski/prehrambeni industriji in s tem stabilnosti in trajnosti gospodarskih sistemov.

Sodobna ideja o t.i. "kemičnem iskanju" (chemical prospecting) v terapiji uporabnih učinkovitih substanc med floro in favno naravnih bioloških sistemov, predstavlja zato vodilo mnogih raziskovalcev, ki na pobudo farmacevtskih koncernov iščejo v ekotipih zdravilnih in aromatičnih rastlin povezavo med strukturo, delovanjem/učinkovitostjo in se hkrati zavzemajo za njihovo ohranitev.

Pravtako gospodarsko razvite države sveta uvajajo vse ostrejša predpisa, standarde in priporočila glede pridelave zdravju neškodljivih, učinkovitih in kakovostnih surovin, namenjenih neposredno končnim potrošnikom ali predelovalni industriji. Nedavno sprejeta "Pravila, ki usmerjajo kakovost zdravil rastlinskega izvora v Evropski skupnosti" (OJ-EC/2444 /18.7.1989) (1) poudarjajo, da je za oblikovanje kakovostnega rastlinskega zdravila (proizvoda) zelo pomembno, da so vhodne rastlinske vrste taksonomsko definirane, da je poznan njihov genetski izvor in način pridobivanja. Evropske kmetijske institucije/raziskovalne skupine se zavedajoč omenjenih zahtev Evropske skupnosti intenzivno zavzemajo za programe ohranitve genetske variabilnosti zdravilnih rastlin, saj je le-ta orodje v selekciji/žlahtnenju komercialnih različic (varietet) v smeri uniformnosti zelenih lastnosti in v vzdrževanju/povečevanju njihove produktivnosti.

Študij zdravilnih rastlin, evaluacija, uporaba in ohranjanje njihovih izvorov sodijo tudi med pomembne naloge programa Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) in držav članic. V marcu 1988 je v zvezi s problematiko ohranjanja zdravilnih rastlin mednarodna strokovna javnost organizirala posvet, ki so ga financirale WHO, Mednarodna Zveza za ohranjanje narave in naravnih izvorov (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN), Svetovni fond za naravo (World Wide Fund for Nature - WWF) (2). Posvet je podal iniciativo za številne nacionalne programe za inventarizacijo zdravilnih rastlin, ki mora opisati geografsko in klimatsko distribucijo zdravilnih rastlin, izrednotiti njihove izvore (kolekcioniranje divjih akcesij, kultiviranje *in situ* ali *ex situ* v botaničnih vrtovih, komercialni nasadi) in oceniti njihovo pogostnost ali ogroženost.

Tudi v Sloveniji smo se, upajmo da še pravočasno, zavedli nevarnosti izgube genetske variabilnosti rastlinskih vrst, katerih zdravilna učinkovitost oz. uporabna vrednost je že poznana in tistih, ki med drugim odpirajo možnosti za odkrivanje novih proizvodov. Izkoriščanje nekaterih samoniklih zdravilnih rastlin za potrebe farmacevtske in drugih predelovalnih industrij iz naravnih nahajališč

so namreč v preteklosti, močno ogrozile naravne izvore (*Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murb., *Arnica montana* L., *Salvia officinalis* L...). Od okoli 3000 avtohtonih ali introduciranih rastlinskih vrst, ki so v Sloveniji dobro aklimatizirane, jih je po ocenah slovenskih botanikov okoli 10 % ogroženih (od tega 34 prizadetih, 77 ranljivih in 192 redkih) (3).

Ne le iz naravovarstvene etike in dolžnosti do prihodnjih generacij, da zadržimo še dosegljivo naravno dediščino, ampak tudi z gledišča kakovosti je potrebno začrtati ustrezno razvojno strategijo varovanja genetskih izvorov zdravilnih in aromatičnih rastlin (4). Da bi omogočili konkurenčnost slovenskih proizvodov na tujem trgu smo za področje zdravilnih in aromatičnih rastlin pripravili smernice slovenskega nacionalnega programa, ki opredeljujejo strategijo ohranjanja, proizvodnje in kontrole kakovosti zdravilnih rastlin/rastlinskih drog in iz njih izdelanih pripravkov.

2 MATERIAL IN METODE DELA

Prvo stopnjo v realizaciji nacionalnega programa je pomenila zasnova Genetike banke zdravilnih in aromatičnih rastlin v letu 1993 (v okviru KŽK-Kmetijstvo Kranj, laboratorij LFVB), ki predstavlja del Nacionalne zbirke za zdravilne in aromatične rastline (le-ta je bila oblikovana skupaj z Inštitutom za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec v letu 1996). Ta del slovenske nacionalne zbirke je namenjen *in situ* evidentiranju in mapiranju naravnih populacij, njihovemu *ex situ* vrednotenju (morfološko, ekofiziološko, kemijsko, farmakološko) in razvoju uporabne vrednosti pridobljenih akcesij. Metodologija, ki smo jo zasnovali za potrebe *in situ* in *ex situ* ohranjanja in vrednotenja biološke raznovrstnosti temelji na naslednjih izhodiščih:

1. Inventarizacija naravnih izvorov, ki vključuje:
 - identifikacijo in mapiranje naravnih populacij zdravilnih in aromatičnih rastlin z detajlnim definiranjem in specifikacijo klimatoloških ter pedoloških značilnosti proučevanih ekosistemov,
 - identifikacijo fitocenoz v naravnih ekosistemih.
2. Aktivno ohranjanje naravnih izvorov (varstvo in ohranjanje *in situ*).
3. Zmerna in smotrna raba naravnih izvorov, ki je omejena na izkoriščanje genetskega materiala za potrebe *ex situ* opazovanja, med katera sodijo:
 - kemotaksonomsko vrednotenje in klonsko razmnoževanje rastlinskega materiala,
 - fenološka ter ekofiziološka opazovanja ekotipov zdravilnih in aromatičnih rastlin v posameznih fenofazah razvoja, na več eksperimentalnih lokacijah,
 - kemijsko vrednotenje avtohtonih in/ali introduciranih aromatičnih oz. farmakološko učinkovitih rastlin
 - selekcija in vzgoja rastlinskega materiala v smeri uniformnosti in stabilnosti kemijskih značilnosti, ki določajo uporabno (tržno vrednost) izbranih zdravilnih in aromatičnih rastlin.

4. Preprečevanje masovnega izkoriščanja naravnih izvorov prek postopne introdukcije poznanih genotipov v agrosisteme za njihovo pridelovanje v ustreznih rajonih Slovenije. Introdukcija temelji na proučevanju proizvodnih možnosti za zdravilne in aromatične rastline na poskusnih lokacijah, na preizkušanju in dokumentiranju različnih tehnologij za njihovo pridelovanje na referenčnih lokacijah, spremljanju količine pridelka in kakovosti rastlinskih drog.

V omenjeni nacionalni zbirki so prisotne rastline (650 akcesij), ki bodisi ne zagotavljajo uniformnega potomstva (zaradi tujeprašnosti, navzkrižnega oprasovanja) ali pa je generativno razmnoževanje počasnejše od vegetativnega. Zaradi velike morfološke in kemijske variabilnosti, ki se pojavlja v omenjenih primerih, je za potrebe genske banke/nacionalne zbirke potrebna vzgoja klonskega materiala, da bi zagotovili homogenost zanimivih akcesij za kasnejše potrebe selekcije in žlahtnenja. Postopki preizkušanja in *in vitro* razmnoževanja so bili nedavno predstavljeni (5).

Za tkivno razmnoževanje so bile izbrane akcesije artičoke (*Cynara scolymus* L. cv. 'Istra' in cv. 'Romanesco'), dobre misli (*Origanum vulgare* L. ssp. *heracleoticum* - ORI 9/1 Wies), materine dušice (*Thymus vulgaris* L. - THY 12/91), žajblja (*Salvia officinalis* L. - SALV 25/89) in šentjanževke (*Hypericum perforatum* L. - HYP 1/77), ki so rasle na opazovalnih lokacijah (predalpsko in severno-obalno območje Slovenije) Nacionalne zbirke LFVB.

Pri artičoki (*Cynara scolymus* L.) je bila uporabljena metoda mikropropagacije prek rastnih vršičkov, pri dobri misli (*Origanum vulgare* L.), materini dušici (*Thymus vulgaris* L.), žajblju (*Salvia officinalis* L.) in šentjanževki (*Hypericum perforatum* L.) pa nodalno segmentiranje aksilarnih poganjkov.

Tkivne kulture so rasle v rastni komori, osvetljeni s fluorescenčnimi svetilkami (intenziteta osvetlitve 2000 luksov, kar ustreza $31.4 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotosintetsko aktivne radiacije), pri temperaturi $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in fotoperiodi 12 ur svetlobe. Po končanem *in vitro* razmnoževanju smo ukoreninjene poganjke prenesli v rastlinjak ($T = 22 \pm 3^\circ\text{C}$, relativna zračna vlaga $72 \pm 1\%$) in jih presadili v lončke, napolnjene z organskim substratom ter jih redno zalivali.

Makroskopska opazovanja in meritve so bile ocenjene v 3 ponovitvah, ki smo jih zasnovali po predhodnih tipalnih preizkušanjih mikropropagacije. Rezultati prikazujejo bistvene splošne značilnosti tkivnega razmnoževanja pri proučevanih vrstah/akcesijah.

4 REZULTATI

Za potrebe sukcesivne evaluacije avtohtonih in introduciranih akcesij zdravilnih in aromatičnih rastlin v okviru genske banke, mapiranje in dokumentiranje evidence o naravnih nahajališčih in obdelavo pridobljenih informacij o naravnih ekosistemih smo pri Biotehniški fakulteti razvili relacijsko bazo MEDPLANT.

MEDPLANT baza deluje na relacijskih principih: na *in situ* in *ex situ* lokacijah zbrani podatki se vpisujejo v ustrezne podatkovne baze (sistematika, geografija, habitati, pedološke značilnosti, fitocenoze, kemijske analize, ekotipi,...). Kazalci, ki povezujejo posamične podatke v teh bazah omogočajo iskanje medsebojnih povezav med željenimi lastnostmi in tako omogočajo iskanje visoko vrednih genotipov, namenjenih selekcijemu/žlahtniteljskemu delu in proizvodnji kakovostnega semena.

Trenutno bazo MEDPLANT dopolnjujemo s sodobnimi mednarodnimi standardi/pravili in nam bo v veliko pomoč pri iskanju povezav med ustvarjenimi podatkovnimi bazami in pri pripravi ustreznih deskriptorjev, ki slonijo na morfoloških značilnostih opazovanih populacij in na njihovih kemijskih ter bioloških posebnostih.

Na podlagi redkih objavljenih del, lastnega znanja in izkušenj smo razvili tehnike hitrega razmnoževanja za naslednje vrste: artičoka (*Cynara scolymus* L.), dobra misel (*Origanum vulgare* L.), materina dušica (*Thymus vulgaris* L.), žajbelj (*Salvia officinalis* L.), šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.).

Sterilizacija rastlinskega materiala se je izkazala za eno najtežavnejših stopenj mikropropagacije proučevanih zdravilnih in aromatičnih rastlin. Poleg načina sterilizacije je pri zasnovi tkivnih kultur zelo pomemben čas odvzema eksplantatov z matičnih rastlin. Najprimernejše obdobje za odvzem izvornih tkiv je faza zgodnjega začetka vegetacije oz. naravne aktivacije aksilarnih brstov (zgodaj spomladi) nikakor pa za odvzem niso primerni poletni meseci, ko so rastline v fazi vegetativnega razraščanja ali cvetenja. Pri dobri misli smo poleg tega opazili, da zasnova tkivne kulture z apikalnimi brsti pogosto sproži fruktifikacijo *in vitro*, ki istočasno oslabi rast (vigor) vegetativnega poganjka.

Pri vseh proučevanih akcesijah zdravilnih in aromatičnih rastlinah smo po sterilizaciji rastlinskega materiala preizkusili več hranilnih gojišč za rast, razvoj in ukoreninjenje poganjkov.

Na osnovnem hranilnem gojišču brez dodanih rastnih hormonov (hranilno gojišče pH= 5.7, sestavljeno iz makro- in mikro-elementov Murashige Skoog, tiamin-HCl 0.4 mg/l, mio-inozitol 100 mg/l, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 0.174 g/l, agar 6 g/l, saharoza 25 g/l) so se lepo razvijale in zagotavljale zadovoljivo stopnjo razmnoževanja dobra misel, materina dušica in šentjanževka.

Optimalni medij za tkivno razmnoževanje pri žajblju je vseboval v osnovnem mediju IAA (0.5 mg/l) in kinetin (0.1 mg/l). V hranilna gojišča za začetne kulture je pri dobri misli, materini dušici in žajblju priporočljivo dodajanje giberelinske kisline (GA₃), v gojišča za ukoreninjenje poganjkov pa rastni regulator B₉ (Alar 85). Artičoka potrebuje za optimalno proliferacijo v hranilnem gojišču prisotnost auksinov (IAA, 0.5 mg/l) in kinetinov (5 mg/l pri cv. 'Romanesco' in v prvih tednih kultiviranja *in vitro* višjo koncentracijo 10 mg/l pri cv.'Istra') ter pri cv.' Romanesco še prisotnost L-tirozina (50 mg/l). Ergokalciferol ne pospešuje stopnje ukoreninjenja pri nobenem od proučevanih kultivarjev artičoke. Vse rastlinske vrste so v klimatiziranem rastlinjaku sorazmerno uspešno preživele fazo aklimatizacije in bile nato po 3 tednih rasti uspešno presajene na prosto.

Danes se pri omenjenih rastlinskih vrstah mikropropagacija uporablja že rutinsko.

POVZETEK

V razvitem svetu je postala v zadnjem času aktualna skrb za ohranjanje genetske variabilnosti njihovih surovin - zdravilnih in aromatičnih rastlin in ekosistemov, v katerih so se tekom evolucije razvile. Zato v svetu vodilne zdravstvene in kmetijske institucije ter farmacevtska industrija uvajajo ustrezne nacionalne programe, v okviru katerih je predvidena inventarizacija zdravilnih rastlin, izvedenost njihovih izvorov (kolekcioniranje divjih akcesij, kultiviranje *in situ* ali *ex situ* v botaničnih vrtovih, komercialni nasadi), ocena njihove ogroženosti in racionalna izraba v selekcijske/žlahtniteljske namene. S strani Evropske skupnosti zahtevana standardizacija surovin je prav tako ena prioritarnih nalog na področju proizvodnje kakovostnih rastlinskih zdravil. Tudi v Sloveniji smo za področje zdravilnih rastlin pripravili smernice nacionalnega programa, ki opredeljujejo strategijo ohranjanja, proizvodnje in kontrole kakovosti zdravilnih in aromatičnih rastlin in rastlinskih zdravilnih pripravkov. Relacijska baza MEDPLANT, ki smo jo razvili v Sloveniji, rutinsko uvedeni postopki tkivnega razmnoževanja ter sukcesivno uvajanje postopkov mikropropagacije pri novih rastlinskih vrstah/akcesijah so v okviru genske banke neobhodno orodje pri ohranjanju naravnih izvorov in pri sodobnem vrednotenju ekotipov zdravilnih in aromatičnih rastlin, namenjenih introdukciji v slovenski pridelovalni prostor.

IN SITU IN EX SITU CONSERVATION OF NATURAL RESOURCES OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS IN SLOVENIA

ABSTRACT

In Slovenia, medicinal and aromatic plants (MAP) were identified as minor crops that could be of national interest within sight of their cultivation as well as of marketing of their alternative products. Being aware of degradation of natural ecosystems and of losing plant biodiversity, which is essential for selection and breeding work Slovenian Fund for Nature has recently ratified the Resolution on conservation of biological diversity and permanent landscape development, with special reference of *in situ* conservation of MAP. National collection (Genebank) of MAP was officially recognised and supported by Slovenian government in 1995 and 1996. At present, this genebank holds 650 accessions of MAP, some of which have been evaluated chemically and/or biologically. In the frame of MAP Genebank, *in situ* and *ex situ* conservation strategy is planned to be achieved by inventarization of natural resources, their conservation *in situ*, by sustainable use of natural resources limited on exploitation of germplasm for *ex situ* genebank and by prevention of massive exploration. Because of high morphologic and chemical variability of MAP species, current horticulture technique for vegetative

propagation - tissue culture has been introduced as one of genebank technologies with the aim of obtaining rapid and economical propagation method, which will ensure homogeneity of interesting accessions in future. In globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) micropropagation method using shoot apices was applied, but in oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and in St. John's-wort (*Hypericum perforatum* L.) nodal segments were used for establishing of tissue culture. Sterilisation of plant material was one of the most problematic stages in micropropagation procedure because accessions of the same plant species specifically responded to the concentration of sterilisation solution as well as to the time of sterilisation.

4 LITERATURA

1. Anonymus (1989). The Rules governing Medicinal Products in the European Community, Vol III. Guidelines on the quality, safety and efficacy of medicinal products for human use. Commission of the European Communities, (OJ-EC/2444 /18.7.1989), s. 30-37.
2. Wagner H. in Farnsworth N.R. (1990). Economic and Medicinal Plant Research. Volume 4: Plants and Traditional Medicine. Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London, 174 s.
3. Aljančič M., Gregori J., Praprotnik N., Hlad B., Peterlin S., Skoberne P., Vidic J. (1995). Varstvo narave v Sloveniji, Naravoslovni muzej Ljubljana, 87 s.
4. Baričević D. (1996). Ohranjanje biološke raznovrstnosti zdravilnih in aromatičnih rastlin - vloga v razvoju novih zdravil.- Kmetijstvo, ki ohranja biološko raznovrstnost. Zbornik mednarodnega seminarja, Slovenski sklad za naravo, Ljubljana, s. 113-119.
5. Eržen-Vodenik M., Baričević D. (1996). Tkivno razmnoževanje pri zdravilnih in aromatičnih rastlinah.- Zbornik mednarodnega simpozija Novi izzivi v poljedelstvu '96, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, s. 201-206.

Adrese autora - Authors' adresses:

Dea Baričević
Biotehniška fakulteta
Jamnikarjeva 101
1111 Ljubljana, p.p.95, SL

Alenka Zupančič,
Maša Eržen-Vodenik
M-KŽK Kmetijstvo Kranj, LFVB
4000 Kranj, Begunjska 5, SL

Andrej SELIŠKAR
Znanstveno raziskovalni center SAZU,
Biološki inštitut,
Novi trg 5, 1000 Ljubljana, SL

Primljeno - Received: